

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA
FARMACEUTICHE

TESI SPERIMENTALE DI LAUREA

Sintesi di derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici quali potenziali inibitori di RANBP1, un emergente target per la terapia antineoplastica

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Schenone

Candidata:

Alessia Gaggero

Correlatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Musumeci

Anno Accademico 2022/2023

ABSTRACT

RANBP1 è una proteina citoplasmatica di 201 amminoacidi in grado di formare un complesso con RANGAP1 e RAN-GTP, catalizzando l'idrolisi del GTP a GDP. RANBP1 è quindi implicata nella regolazione delle attività mediate da RAN, tra cui l'importazione e l'esportazione nucleare di proteine, acidi nucleici e microRNA, e il controllo della stabilità mitotica.

Nel corso del tempo, è stato dimostrato che RANBP1 è coinvolta in malattie neoplastiche, nella regolazione del sistema nervoso centrale, nel ciclo di vita virale e batterico, e nell'infertilità. Proprio da queste informazioni è nato l'interesse del gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale, in collaborazione con i gruppi di modellistica molecolare e di genetica medica dell'Università Magna Graecia di Catanzaro, per questo target. In particolare, mediante studi di docking e dinamica molecolare, è stata analizzata la struttura di RANBP1 ed è emerso che questa proteina presenta tre tasche, di cui solo la 1 e la 3 sono effettivamente accessibili per ligandi sintetici. La libreria interna dei composti a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica, sintetizzati originariamente come inibitori ATP competitivi delle tirosina chinasi citoplasmatiche Src e Abl, ampliata con nuovi analoghi strutturali, è stata sottoposta ad uno screening *in silico*, che ha permesso di selezionare i 10 migliori potenziali ligandi rispettivamente per la tasca 1 e 3. In questo contesto, il mio lavoro si è focalizzato sulla purificazione-ripreparazione dei composti di precedente pubblicazione e sulla sintesi dei tre nuovi composti identificati da studi di modellistica molecolare, i derivati **2a-c**. Alcuni composti sono stati già valutati in un test preliminare su una linea cellulare di leucemia linfoblastica T, e in particolare il composto **2c** ha mostrato un'elevata azione citotossica nel range nanomolare. Saggi specifici su RANBP1 verranno effettuati sui composti più promettenti.

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1 RUOLO DI RANBP1 NEL TRASPORTO NUCLEARE	7
1.2 RUOLO DI RANBP1 NELLA STABILITÀ MITOTICA.....	11
1.3 PANORAMICA DELLE MALATTIE.....	14
1.3.1 RANBP1 e malattie neoplastiche	15
1.3.2 RANBP1 e malattie del sistema nervoso centrale	22
1.3.3 RANBP1 nel ciclo di vita virale e batterico	24
1.3.4 RANBP1 nella teratogenesi e nell'infertilità	25
2. PROGETTO	27
3. DISCUSSIONE.....	30
3.1 CHIMICA.....	30
3.2 BIOLOGIA	34
4. CONCLUSIONI	36
5. PARTE SPERIMENTALE.....	37
6. BIBLIOGRAFIA.....	51

1. INTRODUZIONE

RANBP1 (Ran binding protein 1) è un enzima codificato da un gene chiamato *RANBP1* o *HTF9A*, allocato sul cromosoma 22 nel locus 22q11.21, costituito approssimativamente da 11.418 basi.^{1,2} Sono stati identificati sessantatré promotori e intensificatori della sintesi di RANBP1, tra cui GH22J020114 e GH22J020113.³ La proteina RANBP1 è costituita da 201 amminoacidi e tra i residui amminoacidici 26 e 164 contiene un dominio di binding 1 (binding domain 1, BD1), coinvolto nell'interazione proteina-proteina con RAN (Ras-related nuclear protein) e nella segnalazione cellulare (**Figura 1**).⁴

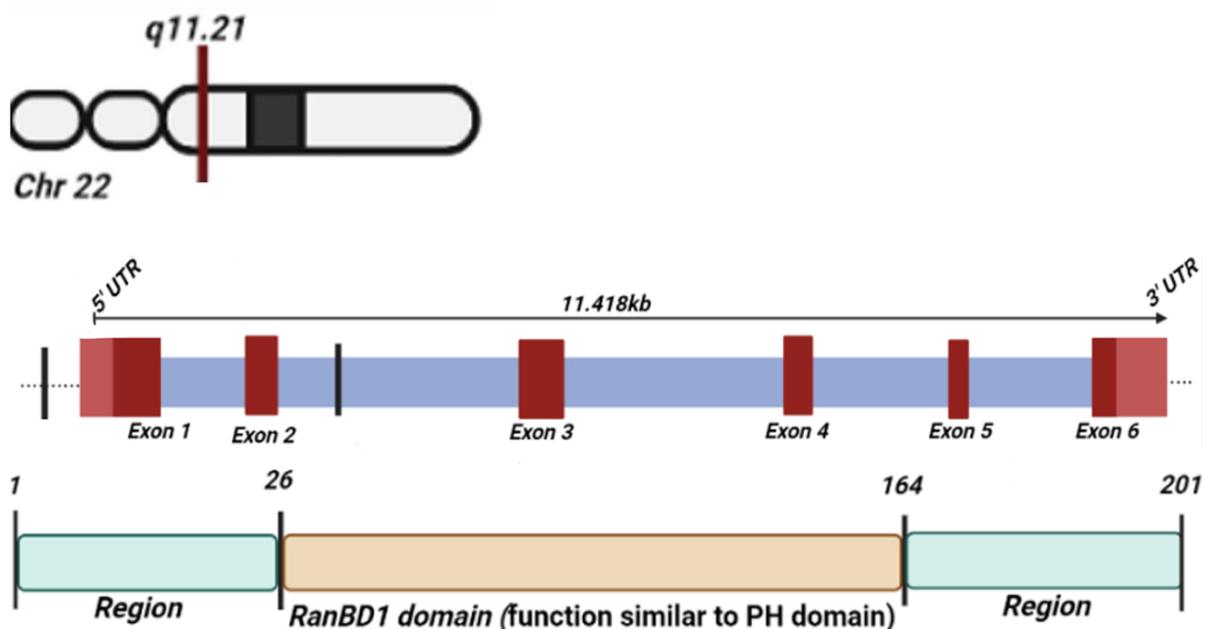


Figura 1. Rappresentazione schematica della localizzazione cromosomica del gene *RANBP1* e della struttura di RANBP1.

RANBP1 possiede molteplici varianti trascrizionali, codificate da differenti pseudogeni allocati sui cromosomi 17, 9, 12 e X.⁵ RANBP1 è una proteina intracellulare espressa principalmente a livello citoplasmatico, ma è stata determinata anche a livello nucleare. Per quanto riguarda la sua distribuzione tissutale, RANBP1 è localizzata prevalentemente nella corteccia cerebrale,

nel testicolo, nel tratto intestinale, negli epitelii squamosi, nei tessuti linfoidei ed ematopoietici.^{6,7} In particolare, è presente in tutta la linea cellulare immunitaria, con un'elevata specificità nelle cellule T e B.⁸ Infine, relativamente alla sua trascrizione in specie diverse, RANBP1 ha mostrato generalmente una bassa specificità, essendo stata rivelata nel cervello umano, murino e di maiale.⁹

Per quanto riguarda l'attività, RANBP1 forma un complesso con la proteina RAN (Ras-related nuclear protein). RAN è una GTP-asi, appartenente alla superfamiglia Ras (Rat sarcoma virus), che idrolizza il GTP a GDP, presentando quindi un'attività idrolitica selettiva per il nucleoside guanosina. Come regola generale, le GTP-asi sono in forma attiva quando legano il GTP e in forma inattiva quando legano il GDP. Il passaggio da una forma all'altra richiede la partecipazione di diversi fattori, in dettaglio RCC1 (Regulator of chromosome condensation 1) e GAP1 (RAN GTPase-activating protein 1).

RCC1 è il fattore di scambio nucleare specifico per RAN, ed è anche indicato come RANGEF (GTPase exchange factor), ha una localizzazione nucleare e catalizza la formazione del complesso RAN-GTP, attivando RAN. GAP1 ha una localizzazione citoplasmica e, insieme a RANBP1, forma un complesso con RAN-GTP catalizzando la formazione RAN-GDP, e accelerando l'idrolisi del GTP a GDP. Di conseguenza inattiva RAN.¹⁰ È interessante sottolineare che RANBP1 è in grado di interagire con RAN-GTP, ma non con RAN-GDP. L'effetto di questa interazione è quello di migliorare esponenzialmente l'efficienza dell'idrolisi di RAN-GTP mediata da RANGAP1,^{10,11} (**Figura 2**).

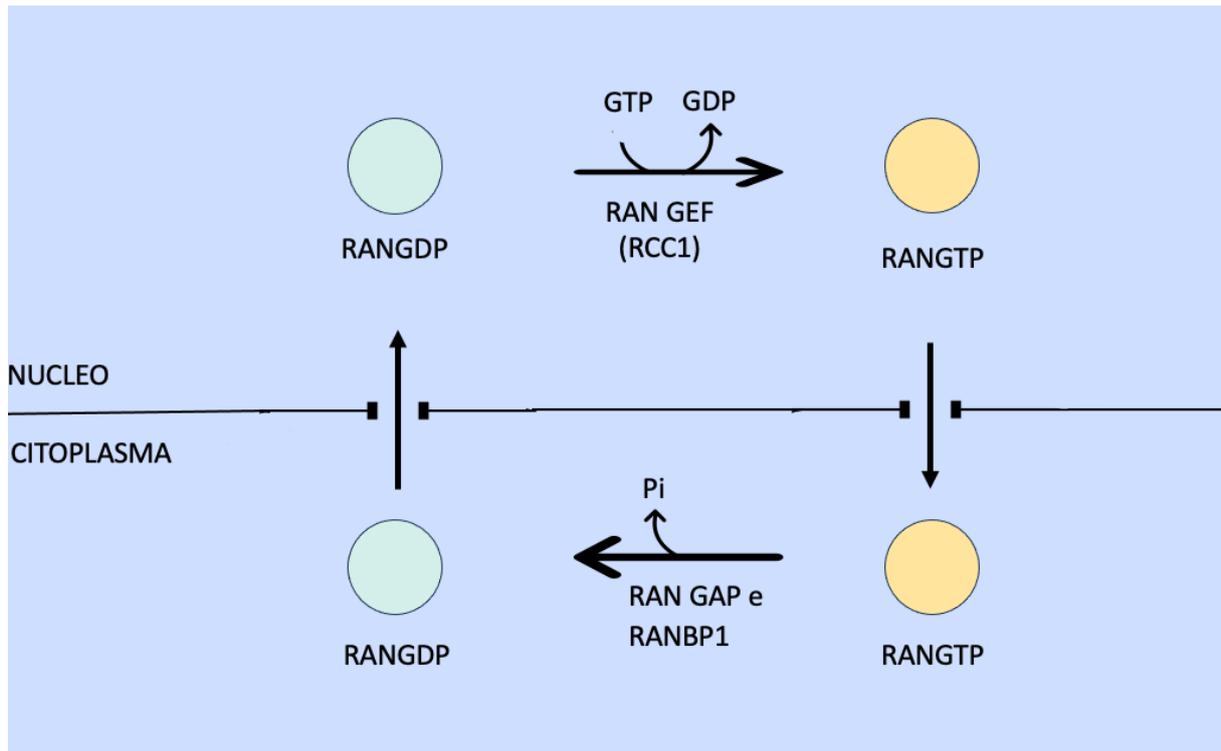


Figura 2. Schema rappresentante il passaggio da RAN-GDP a RAN-GTP, e viceversa, mediato dalle opportune proteine nel nucleo e nel citoplasma.

L'attivazione/inattivazione di RAN permette la regolazione del ciclo cellulare tramite il controllo di proteine ed acidi nucleici nel nucleo.¹ Più in dettaglio, tra le funzioni molecolari cruciali attribuite a RANBP1 vi sono la regolazione del trasporto nucleo-citoplasmatico RAN dipendente di varie proteine,¹² la regolazione dell'assemblaggio del fuso mitotico e la progressione della mitosi.^{13,14,15}

Nei successivi paragrafi vengono illustrate queste specifiche attività in cui RANBP1 svolge un ruolo chiave.

1.1 RUOLO DI RANBP1 NEL TRASPORTO NUCLEARE

Il trasporto nucleare di molecole di peso superiore a 60 kDa richiede energia. Tale energia è fornita dal GTP in un processo mediato dalla RANGTP-asi. Affinché tale trasporto avvenga sono necessari anche altri fattori, in particolare le sopracitate proteine RCC1 e GAP1, le importine, le esportine e RANBP1. Le importine e le esportine, definite anche recettori di importazione nucleare, sono molecole in grado di legare le proteine cargo, permettendo il loro trasporto dal citoplasma al nucleo e viceversa.¹⁶ Le proteine cargo per essere riconosciute dal recettore di importazione nucleare presentano sequenze specifiche. In particolare, le proteine che devono essere trasportate dal citoplasma al nucleo presentano una sequenza ricca di lisina e arginina, che prende il nome di segnale di localizzazione nucleare (NLS, nuclear localization signal), ed è riconosciuta dalle importine. Le proteine che invece devono essere trasportate dal nucleo al citoplasma presentano una corta sequenza di quattro aminoacidi idrofobici (spesso leucine), che prende il nome di segnale di esportazione nucleare (nuclear export signal, NES), e permette il riconoscimento selettivo da parte delle esportine. Per quanto riguarda il processo d'importazione nucleare, (**Figura 3A**), le importine si legano alle proteine cargo, nel lato citoplasmatico, e consentono interazioni con il complesso dei pori nucleari, promuovendo la traslocazione del complesso nel nucleo. Una volta all'interno del nucleo, RAN-GTP, formato a partire da RAN-GDP per una reazione catalizzata da RCC1, si lega all'importina e favorisce il rilascio di proteina cargo. Il complesso importina-RANGTP è poi trasferito nel citoplasma, dove RAN-GTP viene distaccato dall'importina attraverso l'idrolisi del GTP dipendente da RANBP1 e RANGAP1. RANBP1, legato a RAN, contribuisce in vari modi a promuovere l'importazione nucleare: (i) stabilizza l'interazione RAN-importina, promuovendo l'importazione di proteine attraverso il complesso dei pori nucleari;^{17,18} (ii)

favorisce l'aggancio del complesso ai pori nucleari e la traslocazione attraverso la membrana nucleare; (iii) migliora il collegamento tra le fasi di legame e di traslocazione.

Uno studio ha mostrato che l'anticorpo monoclonale ARAN1, specifico per RAN umano, quando iniettato nelle colture cellulari, inibisce l'importazione di proteine nel nucleo, sopprimendo il legame di RANBP1 al complesso RAN-importina.¹⁹ In conclusione, queste prove hanno permesso di dedurre che il legame di RANBP1 al complesso RAN-importina è essenziale e limitante per la dissociazione del complesso nel citoplasma, da cui ne deriva il rilascio di RAN e il suo successivo riciclo e riutilizzo nucleare.

Il ciclo di esportazione, (**Figura 3B**), è comparabile a quello d'importazione. RAN-GTP, ottenuto dalla reazione catalizzata da RCC1, induce il legame tra la proteina cargo e l'esportina all'interno del nucleo. Il complesso RANGTP-esportina-cargo attraversa quindi i pori nucleari e permette il trasporto delle opportune molecole nel citoplasma. Nel citoplasma RANBP1 e RANGAP1 si legano a RAN-GTP catalizzando l'idrolisi del GTP a GDP. In seguito a questa reazione, il complesso si dissocia e le esportine vuote sono pronte per ripassare nel nucleo ricominciando il ciclo.

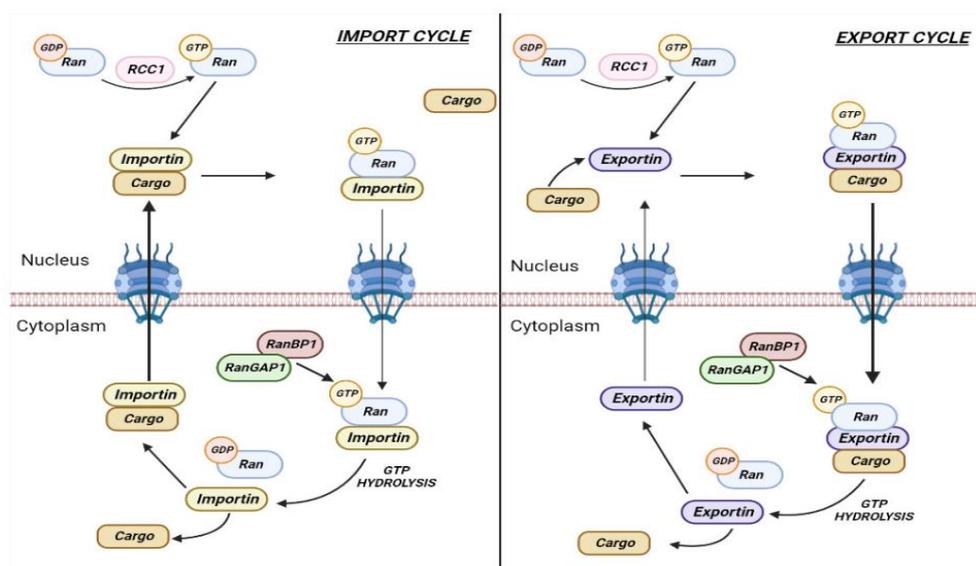


Figura 3. RANBP1 media il trasporto nucleare attraverso il complesso RAN (modello arbitrario presunto). Cicli di importazione (**pannello A**) ed esportazione (**pannello B**) del nucleo e modello per il riciclo delle importine/esportine (proteine trasportatrici).¹

RANBP1 svolge un ruolo cruciale nel trasporto nucleo-citoplasmatico RAN dipendente, in particolare per quanto riguarda l'esportazione del tRNA. Infatti, uno studio ha dimostrato che, praticando un'iniezione nucleare di RANGAP-RANBP1, si ottiene un blocco dell'esportazione dei tRNA, ma non dello splicing degli mRNA, dimostrando che gli mRNA potrebbero usare un percorso di esportazione RAN indipendente.²⁰ Tuttavia, questo potrebbe essere un meccanismo variabile, specie e tessuto specifico. Diverse ricerche sono state condotte al fine di elucidare il ruolo di RANBP1 nell'esportazione nucleare. Uno studio condotto su una piccola proteina G nucleare-1,^{14,15} identica alla sequenza codificante di *RANBP1*,¹⁸ ha messo in luce che questa proteina è un co-attivatore di RANGTPasi, capace di complessarsi con RAN-GTP e RCC1-RAN, mantenendo quest'ultimo complesso in uno stato meno reattivo per lo scambio di nucleotidi guanina su RAN. Nel complesso, la ricerca evidenzia il ruolo di RANBP1 nell'inibire lo scambio GDP-GTP RCC1 dipendente su RAN. Come suggeriscono gli autori, tale risultato tuttavia pone il dubbio che questi fattori, almeno temporaneamente, siano presenti nello stesso compartimento cellulare.¹⁵ Un ulteriore studio, eseguito su campioni di estratto di uova di *Xenopus*, ha messo in luce che la diminuzione di RANBP1 e RCC1 non porta ad anomalie, mentre, l'alterazione del rapporto di queste due proteine induce difetti nella replicazione del DNA, nell'assemblaggio nucleare e nel trasporto nucleare delle proteine. Da questa evidenza consegue che il punto cruciale per la normale progressione del ciclo cellulare è l'equilibrio del rapporto RANBP1/RCC1.²¹ Allo stesso tempo, è stato confermato il ruolo di RANBP1 nel meccanismo di disassemblaggio del complesso del recettore di trasporto-RANGTP, definendo così un ruolo come processore catalitico nelle fluttuazioni della GTPasi, con conseguente idrolisi del GTP.²²

Parlando del trasporto nucleare, risulta interessante specificare come sia regolata la localizzazione di RANBP1 esclusivamente a livello citoplasmatico. Infatti, le piccole dimensioni di RANBP1 inizialmente suggerivano il passaggio attraverso i pori per diffusione

passiva. Uno studio di particolare interesse, in cui è stata utilizzata leptomicina B come inibitore dell'esportazione nucleare, ha portato a una revisione di tale ipotesi. In presenza di leptomicina B, è stato ottenuto un accumulo nucleare di RANBP1, dimostrando la traslocazione di RANBP1 avviene attraverso un meccanismo attivo che necessita il coinvolgimento di RAN-GTP e una NES.^{12,23,24} Infatti, in seguito alla rottura della membrana nucleare (inizio della mitosi nella fase M), le componenti solubili nucleari e citoplasmatiche collassano insieme. Quando la membrana nucleare si riforma, RANBP1 viene esportato, aderendo al lato citoplasmatico della nascente membrana nucleare, mentre la maggior parte del RAN cellulare si accumula nel nucleo. Un NES evita che RANBP1, a causa delle sue piccole dimensioni, diffonda passivamente nel nucleo, causando il sequestro nucleare di RAN e l'inibizione dell'importazione di proteine.^{23,24} Lo spostamento di RANBP1 può essere usato per liberare i pori nucleari di RAN-GTP, così prevenendo il rilascio prematuro di proteine cargo dal complesso di trasporto nucleare. Recentemente è stato dimostrato che RANBP1 è essenziale e limitante nel trasporto di pre-microRNA (pre-miRNA), modulando l'azione di RAN e RANGAP1 e garantendo il mantenimento di un gradiente nucleo-citoplasmatico di GTP/GDP, il quale consente l'esportazione di pre-miRNA, in assemblaggio a Esportina-5, quindi garantendo il loro afflusso e maturazione citoplasmatica.²⁵ Il mantenimento del gradiente GTP/GDP attraverso la membrana nucleare è influenzato dalla fluttuazione della serina-treonina chinasi 1 (SGK1) attraverso la regolazione trascrizionale SP1-dipendente di RANBP1 e RANGAP1. Questo meccanismo ha caratteristiche pleiotropiche, ed è stato verificato sia nelle linee cellulari primarie normali che in quelle tumorali, e sembra funzionare come un generale meccanismo epigenomico (**Figura 4**).

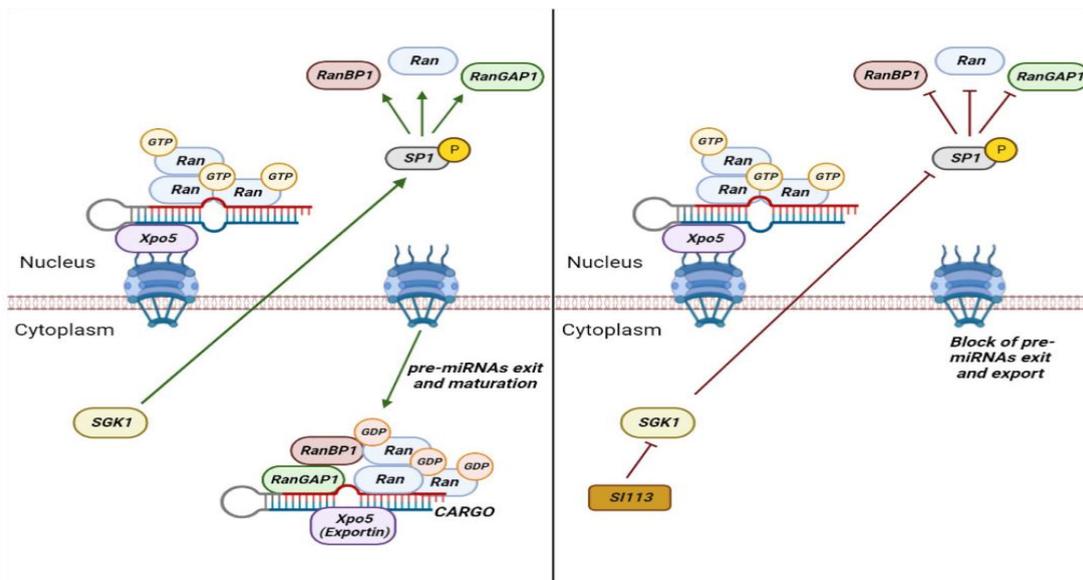


Figura 4. SGK1 regola l'asse RAN/RANBP1/RANBP1, influenzando l'esportazione e la maturazione nucleare dei pre-miRNA nucleari. La figura illustra la regolazione dell'esportazione nucleare dei pre-miRNA SGK1 dipendente, modulando il complesso RAN in maniera SP1-dipendente. Al contrario, l'inibizione dell'attività di SGK1 influisce sull'esportazione e la maturazione dei pre-miRNA nel citoplasma (vedere anche sezione 1.3.1).¹

1.2 RUOLO DI RANBP1 NELLA STABILITÀ MITOTICA

Le prime evidenze sul ruolo di RANBP1 nella stabilità mitotica possono essere ricondotte agli studi condotti sul gene murino. Il gene *HTF9* del topo codifica per RANBP1 e, attraverso la sua interazione con la proteina RAN, è implicato in diversi eventi nucleari, come la replicazione del DNA, l'esportazione di RNA, l'importazione di proteine e il monitoraggio del completamento della sintesi di DNA prima dell'inizio della mitosi. Diversi collegamenti sono stati identificati tra *HTF9*, l'espressione del gene di *RANBP1* e la proliferazione cellulare, portando all'evidenza che questo gene esercita un controllo trascrizionale durante il ciclo cellulare.²⁶

I livelli di trascrizione di *RANBP1* sono dipendenti dalla fase del ciclo cellulare. Infatti, seguendo uno schema ciclico, l'espressione di *RANBP1* è sottoregolata nelle cellule in fase G₀, incrementa progressivamente nella fase G₁/S, raggiungendo la massima attività in fase M, con un picco in metafase, per poi diminuire bruscamente durante la telofase.²⁷ Uno studio eseguito

su un modello murino, ha evidenziato che questo andamento è possibile grazie ad un promotore della trascrizione di *RANBP1*, che presenta due siti di legame per due differenti fattori di regolazione, E2F-b e E2F-c. E2F-b e E2F-c guidano funzioni genetiche opposte e regolano la trascrizione di *RANBP1* attraverso meccanismi molecolari diversi. E2F-b è necessario per favorire la regolazione trascrizionale durante la fase S, mentre E2F-c è richiesto per reprimere la trascrizione durante l'arresto della crescita cellulare. Il sito di legame del DNA per E2F-c è più vicino di quello di E2F-b al sito di inizio della trascrizione del gene, e questa allocazione riflette anche i loro differenti ruoli funzionali.²⁸ È stato dimostrato che *RANBP1* svolge un ruolo chiave nella mitosi, promuovendo la segregazione dei cromosomi durante l'anafase attraverso il mantenimento del gradiente ottimale di RAN-GTP.^{29,30} Infatti, nelle cellule di mammifero, durante la mitosi, si ha un incremento del livello di RAN-GTP attraverso la conversione di RAN-GDP a RAN-GTP catalizzata da RCC1. RCC1 è in grado di interagire con i cromosomi e di conseguenza RAN-GTP è localizzato prevalentemente vicino ai cromosomi mitotici, mentre RAN-GDP è in posizione distale ai cromosomi stessi, determinando un gradiente di RAN-GTP. Tale gradiente regola l'assemblaggio del fuso, perché RAN-GTP induce localmente il rilascio dei fattori di assemblaggio del fuso (spindle assembly factors, SAFs).²⁹ A questo punto entra in gioco *RANBP1*, che forma un complesso con RAN e RCC1, inattivando quest'ultimo. Inoltre, *RANBP1* può promuovere l'idrolisi di RAN-GTP attraverso l'aumento di attività di RANGAP1 (**Figura 5**).²⁹

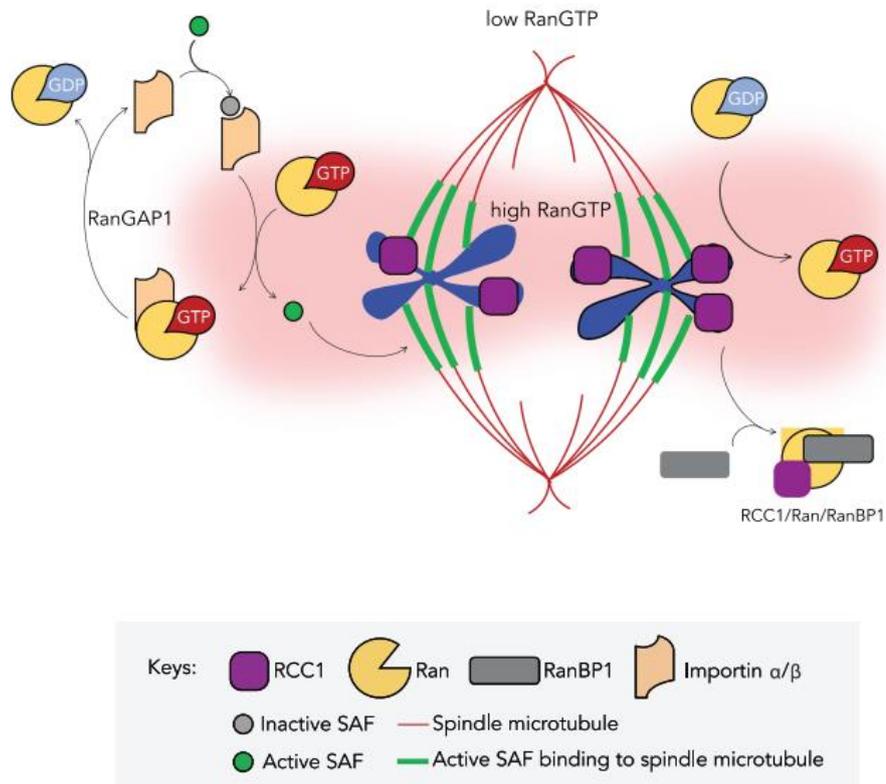


Figura 5. Schematica rappresentazione del coinvolgimento di RANBP1 nella mitosi.²⁹

RANBP1 agisce quindi come inibitore, favorendo l'avanzamento della cellula in mitosi.^{29,31} Nel complesso, RANBP1 regola l'assemblaggio del fuso mitotico, controlla la dinamica dei microtubuli lungo la metafase, garantisce la corretta segregazione dei cromosomi umani nell'anafase, e la riorganizzazione della cromatina nucleare dopo l'uscita della cellula dalla mitosi.³² È interessante notare che la sovraespressione di *RANBP1* è considerata responsabile di anomalie nella mitosi e difetti nell'assemblaggio del fuso.^{33,34} Alti livelli di RCC1 sopprimono il punto di controllo dell'assemblaggio del fuso, almeno negli estratti di uova di *Xenopus*, interrompendo le proteine regolatrici durante il posizionamento del cinetocore. Al contrario, l'aggiunta di RANGAP1/RANBP1 agli estratti ripristina i punti di controllo del fuso, dimostrando così la dipendenza dalle fluttuazioni del livello di RAN-GTP.³⁵ Più dettagliata e biochimicamente determinata è la dimostrazione che la fosforilazione di RANGAP1, in particolare sulla Ser358, è responsabile della stabilizzazione dell'interazione

RANGAP1/RAN/RANBP1. La mutagenesi sito diretta, annullando la fosforilazione di Ser358, riduce la stabilità di questa interazione. Poiché RANGAP1 si comporta come bersaglio sia del cinetocore che del fuso, diventa chiaro come il meccanismo possa influenzare la mitosi.³²

Al contrario, le cellule depletate di RANBP1 subiscono un ritardo durante la transizione in prometafase, spesso seguita da apoptosi.³⁶ Mentre l'espressione degli altri membri della rete RAN è costante durante la mitosi, l'espressione di *RANBP1*, come già detto, è modulata.³⁷ Anche le modifiche post-traduzionali della proteina svolgono un ruolo importante nel controllo della mitosi. Ad esempio, la fosforilazione di RANBP1 dipendente da PLK1 è essenziale per la sua interazione con RAN, per la nucleazione dei microtubuli e per l'assemblaggio del fuso durante la mitosi.³⁸

1.3 PANORAMICA DELLE MALATTIE

Durante i decenni passati è emerso in letteratura il ruolo di RANBP1 sia nel trasporto nucleocitoplasmatico che nella progressione della mitosi, anche supportato dall'avanzare di nuovi approcci biomolecolari, affinando così le conoscenze e completando la rete funzionale di questa piccola proteina correlata alle GTPasi. In ambito strettamente biomedico sono stati condotti studi volti a verificare se, sia nell'aumento che nella perdita della funzione, RANBP1 possa influenzare lo sviluppo o la trasmissione di malattie, e predisporre a contrarre ed alterare il loro decorso. Si sono accumulati molti studi relativi a neoplasie, a malattie del sistema nervoso centrale, a malattie di origine batterica e virale e alle malformazioni congenite. Le principali evidenze a questo proposito saranno approfondite in seguito, (**Figura 6**).

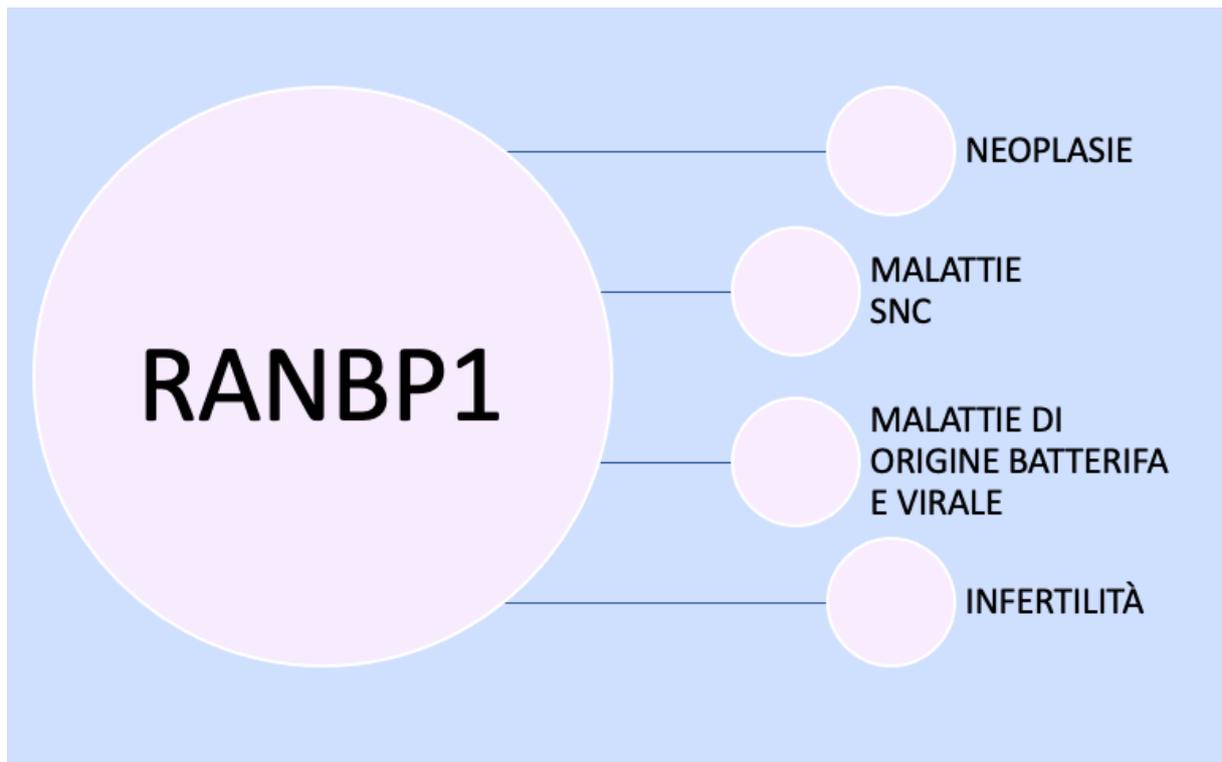


Figura 6. Coinvolgimento di RANBP1 nelle malattie umane.¹

1.3.1 RANBP1 e malattie neoplastiche

La sintesi del modello di trasporto nucleare converge sull'evidenza che l'assemblaggio e il disassemblaggio di tutti i complessi, costituiti da una proteina cargo associato ad una proteina di trasporto (ad esempio carioferina, importina, esportina, o trasportina), sono strettamente controllati dalla GTPasi RAN, la cui azione è regolata da RCC1, RANGAP, e RANBP1. Un interessante effetto sull'invecchiamento dei processi cellulari deriva dal progressivo allungamento della vita umana e dall'innegabile rapporto causale con la crescente incidenza delle malattie neoplastiche in età avanzata. Sono stati analizzati livelli di mRNA per 6000 geni, derivati da fibroblasti dermici umani di soggetti giovani, maturi e anziani. Approssimativamente 1% degli mRNA mostravano cambiamenti dipendenti dall'età: tra i sedici geni noti per essere coinvolti in NCT (traffico nucleo-citoplasmatico), ben quattro mostravano una riduzione dipendente dall'età, e tra questi, il gene che codifica per RANBP1.

Perciò, almeno nelle linee cellulari *in vitro*, la riduzione di RANBP1 in età avanzata può portare ad alterazioni della mitosi e della segregazione dei cromosomi. Un'alterazione della segregazione cromosomica età dipendente è stata dimostrata anche nei linfociti umani. Queste prove, *in vitro*, potrebbero suggerire che le riduzioni di RANBP1 siano un fattore causale della riduzione della risposta immunitaria età dipendente e dell'aumento di aneuploidia.³⁹

È stato stabilito che anche la sovraespressione di *RANBP1* può essere correlata a patologie neoplastiche. Infatti, un aumento di RANBP1 può portare alla formazione di fusi multipolari, attraverso l'induzione della divisione dei centrioli madre e figlio ai poli del fuso. In seguito all'accumulo di errori in questo processo, durante la mitosi si verificano l'irregolare segregazione dei cromosomi e la produzione di cellule aneuploidi o poliploidi, che potrebbero caratterizzare sia l'inizio che la progressione dei tumori.⁴⁰

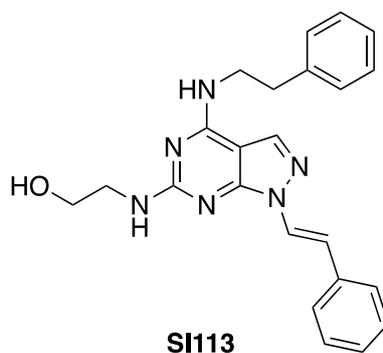
Queste anomalie mitotiche possono essere in parte imputate alla capacità di RANBP1 di promuovere la dissociazione tra RAN e CRM1 (Chromosomal Maintenance 1), un'esportina nota anche con il nome di esportina-1. Uno studio ha messo in luce che la nucleofosmina (NPM), una fosfoproteina ubiquitaria principalmente localizzata nel nucleolo, ma capace di effettuare da navetta tra il nucleo e il citoplasma durante il ciclo cellulare (possedendo sia le sequenze NES che NLS), può diventare un substrato del complesso RAN-CRM1. Questo risultato ha evidenziato un presunto meccanismo per la duplicazione del centrosoma per le sue abilità di associarsi con centrosomi non duplicati e di dissociarsi da loro, in seguito all'inizio della duplicazione del centrosoma e della replicazione del DNA. L'interazione tra i centrosomi e NPM è sensibile all'inibizione dell'esportazione nucleare CRM1 dipendente, indotta dalla sovraespressione di leptomicina B o *RANBP1*. Infatti, la leptomicina B induce una duplicazione prematura del centrosoma nelle cellule quiescenti, che coincide con la dissociazione di NPM dai centrosomi, mentre il deficit di NPM, mediato dall'iperattività di RANBP1, determina la

formazione di centrosomi soprannumerari e fusi multipolari, ed entrambe le condizioni sono associate alla maggior parte delle cellule tumorali umane.⁴¹

Altre evidenze indicano che *eIF4E* (fattore di inizio della traduzione eucariotica) è un potente oncogene capace di alterare il lato citoplasmatico del complesso dei pori nucleari (PNC) e ridurre RANBP2, il componente principale delle fibrille citoplasmatiche del PNC, e indurre un concomitante e compensato aumento di RANBP1, per raggiungere il mantenimento del traffico molecolare, che non è sufficientemente assicurato da RANBP2. Questo meccanismo definisce un aumento dell'esportazione e della traduzione di mRNA e, di fatto, della trasformazione oncogena. Vale la pena ricordare che il trattamento con ribavirina porta ad un aumento di RANBP2 e una riduzione di RANBP1, portando ad un ristabilimento del rapporto standard, correlato a una remissione clinica nei pazienti con leucemia mieloide acuta.⁴² Uno studio condotto su composti chiamati SINE, una nuova generazione di inibitori selettivi dell'esportazione nucleare che agiscono bloccando l'esportina CRM1, mostra che questi derivati sono meno tossici e più gestibili dal punto di vista terapeutico degli altri inibitori, e che la potente attività antileucemica di questi farmaci induce l'apoptosi in diversi sottotipi molecolari della malattia leucemica. KPT-251, un membro rappresentativo di questa nuova classe di inibitori, agisce legando CRM1 quando è stabilizzato nella forma trimerica CRM1-RAN-RANBP1. Ancora una volta emerge il coinvolgimento di quest'ultimo come potenziale fattore di inizio di gravi malattie ematologiche proliferative.⁴³ Negli ultimi anni i lavori clinici traslazionali basati sull'analisi dei livelli di espressione di *RANBP1*, sulle connessioni con i fenotipi tumorali *in vivo*, e sull'avanzamento neoplastico, sono in larga crescita. Recentemente, è stato dimostrato che l'espressione di *RANBP1* è altamente aumentata nel carcinoma epatocellulare (HCC) ed è correlata allo stadio avanzato e al grado istopatologico. Ad esempio, è stato documentato che livelli alti di metilazione del DNA di *RANBP1* sono significativamente correlati a una sopravvivenza globale (OS) molto scarsa,

evidenziando così come l'espressione di *RANBP1* sia associata a prognosi sfavorevole. È stato anche dimostrato che *RANBP1* è fortemente sovraespresso nel compartimento dei linfociti infiltranti il tumore (microambiente tumorale), con particolare riguardo alla componente delle cellule T helper (Th1).⁴⁴ Sorprendentemente, nei melanomi umani metastatici sono stati identificati quattro componenti chiave del meccanismo di trasporto nucleo-citoplasmatico sovraespressi: CRM1, RAN (RANGTPasi), RANGAP1 e RANBP1. Questo pathway potrebbe essere un potenziale bersaglio terapeutico nel melanoma umano, la cui inibizione, mediante la sottoregolazione funzionale di ERK1/2, porterebbe una moltitudine di eventi molecolari dipendenti dal contesto cellulare, innescando l'arresto in fase G1 seguita da apoptosi massiva.⁴⁵ È stato dimostrato che la rete di proteine correlate alla GTPasi RAN, tra cui RANBP1, è coinvolta nell'insorgenza e progressione del cancro ovarico epiteliale. Infatti un'alta espressione di RAN e delle proteine associate XPO7 e TPX2 è correlata ad un aumento dell'invasività tumorale e alla bassa sopravvivenza dei pazienti. Allo stesso modo, *in vivo*, la diminuzione di RAN in un modello di topo di cancro ovarico ha portato alla regressione del tumore. RAN e le sue proteine associate XPO7 e TPX2 possono essere utilizzate come biomarcatori per suddividere i pazienti in base alla qualità e all'aspettativa di vita, attestando il loro significato prognostico. Attraverso l'analisi di una coorte di pazienti con cancro ovarico, è stato dimostrato che i livelli citoplasmatici di RAN, RANBP1, importina beta e RCC1 erano significativamente più alti nei tumori di alto grado, scarsamente differenziati, rispetto ai tumori di basso grado. Tali evidenze indicherebbero la rete di proteine small-GTPasi-RAN come bersaglio per migliorare la sopravvivenza del carcinoma ovarico epiteliale sieroso.⁴⁶ In questo contesto, che inquadra il ruolo di RANBP1 nella deregolazione neoplastica, diversi studi sono stati effettuati al fine di identificare fattori intracellulari in grado di modulare l'attività di RANBP1. Tra questi, è stata identificata in particolare la chinasi SGK1 (serum and glucocorticoid-regulated kinase 1).⁴⁷ SGK1 è implicata nell'inizio e nella deregolamentazione

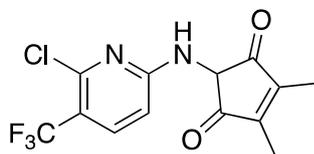
neoplastica, attraverso la sua abilità di bloccare diversi percorsi apoptotici,⁴⁸ di mediare processi di transizione epiteliale-mesenchimale (epithelial–mesenchymal transition, EMT), di indurre la perdita di controllo genomico cellulare attraverso la degradazione di p53 MDM2 (mouse double minute 2) dipendente (MDM2 è un regolatore negativo dell'oncosoppressore p53,⁴⁹ ed è un potente attivatore trascrizionale di *RANBP1*). Infatti, è stato dimostrato che SGK1, attraverso una regolazione positiva dipendente dalla fosforilazione di SP1, induce una potente e stabile attivazione trascrizionale di *RANBP1* nelle linee cellulari di carcinoma del colon.⁵⁰ Viceversa, il silenziamento del gene di *SGK1* corrisponde ad una sottoregolazione dell'espressione di *RANBP1*. Studi biologici, *in vitro* e *in vivo*, hanno dimostrato che la sovraregolazione di *RANBP1* dipendente da SGK1 corrisponde ad un vantaggio nella fuga sia dalla morte mitotica sia dall'apoptosi precoce/tardiva, nonché ad un'instabilità del fuso mitotico, configurando una piena resistenza ai taxani, che viene superata in modelli caratterizzati dal silenziamento di *SGK1* o *RANBP1*. *RANBP1* ha anche dimostrato di essere sensibile alla regolazione SGK1 dipendente in diverse cellule di epatocarcinoma e in modelli murini di HCC xenotrapiantato.⁵¹ In questo sistema, è stato anche dimostrato come la piccola molecola **SI113**, a struttura pirazolo-pirimidinica, sintetizzata dal gruppo di ricerca dove ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale,^{52–58} attraverso il suo blocco enzimatico SGK1 è capace di inibire l'espressione di *RANBP1*. In breve, nel contesto del HCC, l'asse regolatorio SGK1-RANBP1 ha mostrato di mediare i fenomeni della chemio e radioresistenza nelle linee cellulari come *in vivo*.⁵¹



È interessante notare che, nelle linee cellulari HUH7 di HCC, HEK293T di rene embrionale umano, PC3 di cancro della prostata, HDFa di fibroblasti dermici umani primari, OVCAR3 di carcinoma ovarico umano e ADF di glioblastoma umano, il sistema RAN/RANBP1/RANGAP1 gioca un ruolo chiave nel controllo dell'esportazione dei pre-miRNA sotto la regolazione della chinasi SGK1.²⁵ Il meccanismo sembra essere generalmente verificato, poiché si estende a intere librerie di miRNA e a diversi modelli cellulari normali e tumorali non embriologicamente relativi. Il controllo dell'esportazione di miRNA determina la loro maturazione, e quindi porta alla conclusione che l'asse SGK1-RANBP1/RAN/RANGAP1 svolge un ruolo chiave nella regolazione epigenomica cellulare.²⁵ Ulteriori approfondimenti sul ruolo di RANBP1 nel cancro del colon e nel trasporto dei microRNA provengono dal fatto che è stata determinata un'alta espressione di *RANBP1* nei tessuti di CRC (carcinoma colon-rettale) dei pazienti. Il livello di RANBP1 è un fattore di rischio indipendente per una prognosi sfavorevole. Prove funzionali, *in vitro* e *in vivo*, hanno dimostrato che RANBP1 promuove la proliferazione e l'invasione e inibisce l'apoptosi di cellule CRC, sempre attraverso la regolazione dei miRNA. Questi risultati confermano il ruolo biologico e il meccanismo di RANBP1 nel CRC, suggerendo che potrebbe essere usato come potenziale bersaglio diagnostico e terapeutico nel CRC.⁵⁹ In termini di ulteriori approfondimenti sull'argomento, va menzionata l'evidenza per cui il 10% dei pazienti affetti da CRC è portatore di mutazioni BRAF V600E e BRAF, associate a una prognosi peggiore e scarsi risultati verso terapie sistemiche. L'inibizione farmacologica di NPM ha ripristinato efficacemente la suscettibilità delle cellule CRC mutate BRAF resistenti a vemurafenib, sottoregolando l'espressione e l'attività di c-Myc, e di conseguenza sopprimendo i suoi bersagli trascrizionali: RANBP1 e fosfoferina-fosfatasi, che regolano rispettivamente la duplicazione del centrosoma e la biosintesi della serina.⁶⁰ Anche CRM1 presenta caratteristiche oncogeniche nel CRC. È stato dimostrato che uno dei suoi inibitori reversibili, chiamato S109, inibisce la proliferazione e arresta il ciclo cellulare nel CRC.

L'accumulo nucleare di RANBP1 può essere usato come un marcatore dell'inibizione di CRM1.⁶¹

Inoltre, da un approccio basato sull'immunofluorescenza, è stato possibile monitorare la localizzazione subcellulare di RANBP1 nelle cellule del cancro ovarico in seguito alla somministrazione dell'inibitore selettivo **S109**, rafforzando quindi l'ipotesi che CRM1 è un possibile bersaglio nella terapia del cancro, per la sua abilità di bloccare la proliferazione cellulare nel cancro ovarico come nel cancro colon-retto.⁶²



S109

È stata anche studiata l'influenza di RANBP1 sull'apoptosi spontanea e indotta dal taxolo nelle cellule mammarie trasformate. L'inattivazione di RANBP1 produce un microtubulo mitotico ipersensibile e promuove l'apoptosi intramitotica. Tale aumento dell'apoptosi è indipendente dall'espressione di p53 e dipendente dalla caspasi-3, ed infatti, non è stata determinata nella linea cellulare di cancro al seno MCF-7 difettosa di caspasi 3. Questo trova conferma nel fatto che cellule con una ridotta espressione di *RANBP1* presentano un incremento della risposta apoptotica al taxolo, rispetto alla controparte con livelli normali o aumentati di RANBP1, suggerendo che inibitori di questa proteina potrebbero trovare un posto di rilievo nel protocollo terapeutico, che attualmente prevede i taxani come farmaci di prima linea, nonostante la grande variabilità di risposta clinica.⁶³ Sfortunatamente, il meccanismo alla base di questa variabilità rimane sconosciuto. Saggi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che silenziando il gene di CD147, proteina recettoriale transmembrana, si sensibilizzano le cellule tumorali al trattamento con paclitaxel, mentre la sovraespressione di CD147 protegge le cellule tumorali dall'apoptosi

mediata dalla caspasi-3 indotta dal paclitaxel, indipendentemente dallo stato di p53. RANBP1 è coinvolto in questo pathway, infatti, media la stabilità e la dinamica dei microtubuli regolati da CD147 e a sua volta l'efficacia del paclitaxel. In breve, CD147 regola la risposta al paclitaxel interagendo con la coda C-terminale di RANBP1, quindi valutare CD147 come bersaglio potrebbe essere un'altra strategia promettente per prevenire la resistenza al paclitaxel.⁶⁴ Recentemente, si sono accumulate prove a supportare che la sovraespressione della rete proteica RANGTPasi contribuisce all'instabilità cromosomica e peggiora la prognosi dei pazienti affetti da cancro al seno.⁶⁵

1.3.2 RANBP1 e malattie del sistema nervoso centrale

Diversi studi sono stati fatti per valutare il possibile coinvolgimento di RANBP1 in malattie del sistema nervoso centrale. Ad esempio, si è visto che il meccanismo di trasporto nucleocitoplasmico RNA dipendente è essenziale e limitante per il differenziamento della polarità dei neuroni corticali. RANBP1 regola la differenziazione degli assoni, l'arborizzazione dendritica dei neuroni *in vitro*, e la migrazione neurale radiale *in vivo*. Durante la genesi degli assoni, RANBP1 controlla i livelli citoplasmici della chinasi LKB1/PAR4, coinvolta nella polarità neuronale, la cui attività dipende dal meccanismo di esportazione nucleare.⁶⁶ Inoltre, RANBP1 è necessario per stabilire la polarità antero-posteriore, in modo che le cellule della cresta neurale (NC) siano in grado di attivare la chemiotassi.⁶⁷

Un altro studio ha correlato RANBP1 alla sindrome velo-cardio-facciale, chiamata anche sindrome di George, in quanto il gene *RANBP1* è localizzato sul cromosoma 22q11.1, comunemente eliminato in questa patologia. Questa sindrome insorge de novo nel 90% dei casi. In altre circostanze, il difetto genetico può essere trasmesso da un genitore affetto (autosomico dominante). Quando viene trasmessa, colpisce uno su 4000 nati. I sintomi caratteristici includono difetti cardiaci, anomalie facciali, palatoschisi, ipocalcemia (di solito auto-

regressiva), anomalie epatiche, immunodeficienza T, difficoltà di apprendimento (inquadrate nello spettro autistico) e incremento del rischio di malattie mentali. Recentemente è stato possibile identificare più di 200 differenti caratteristiche fenotipiche. In questa sindrome potrebbe essere coinvolto di RANBP1 nella formazione delle ciglia, una struttura che svolge funzioni essenziali durante l'embriogenesi.⁶⁸

Più recentemente, è stata descritta anche la possibile associazione tra la delezione di 22q11.2 e una forma di malattia di Parkinson ad esordio precoce e sensibile alla L-Dopa. La scoperta di questa anomalia genetica potrebbe essere usata come un potenziale marcatore predittivo.⁶⁹ A questo riguardo, va considerato che RANGTPasi è coinvolto nel controllo di crescita neuronale nei mammiferi e nella segnalazione retrograda di assoni nervosi dopo una lesione.¹⁰ Diversi polimorfismi di *RANBP1* (*RANBP1-ht2*) sono stati descritti in soggetti con SPEM (anomalia del movimento oculare di inseguimento costante), una delle principali alterazioni neurofisiologiche in pazienti con disturbo schizofrenico. Tuttavia, fino ad ora nessun aplotipo *RANBP1* sembra essere direttamente associato al rischio di schizofrenia.⁷⁰ Sebbene RANBP1 non abbia ancora una funzione conosciuta specifica durante lo sviluppo del cervello, è altamente espresso nelle zone ventricolari e subventricolari del prosencefalo in via di sviluppo. Questo potrebbe spiegare il suo ruolo nella microcefalia e nei disturbi della connettività corticale, come l'autismo e la sindrome da deficit dell'attenzione, a causa del suo potere selettivo di interrompere il neurone di proiezione corticale.⁷¹ L'anomalia nella segnalazione mediata da mGluR5 (recettore metabotropico del glutammato 5) è coinvolta nei disturbi dello spettro autistico, nella sclerosi tuberosa e nella fisiopatologia della sindrome dell'X fragile. Il simultaneo riscontro di disturbi dello spettro autistico in individui aploinsufficienti per il gene *RANBP1* associato a mGluR potrebbe fornire una relazione genetica tra forme genetiche e ambientali di disturbi dello spettro autistico apparentemente non correlate.⁷²

1.3.3 RANBP1 nel ciclo di vita virale e batterico

Come già riportato, RANBP1 permette l'esportazione dei pre-miRNA grazie al mantenimento del gradiente GTP/GDP. Tale funzione identifica RANBP1 come promotore della riproduzione virale. Studi più specifici sono stati condotti per comprendere il coinvolgimento di RANBP1 in patologie virali e batteriche.

REV (Regolatore dell'Espressione del gene Virale) è una proteina codificata dal genoma di HIV, che permette la fuoriuscita di mRNA virale dal nucleo al citoplasma della cellula ospite. Tale proteina contiene un dominio di legame dell'RNA e un segnale di esportazione nucleare (NES). Si è scoperto che le mutazioni nel dominio NES sono transdominanti e determinano l'inibizione dell'esportazione nucleocitoplasmatica di REV, e di conseguenza l'inibizione dell'HIV. Sono state dimostrate analogie funzionali e strutturali tra il dominio RANBP1-NES e REV-NES dell'HIV. L'evidenza sperimentale porta a ipotizzare che i segnali RANBP1-NES e REV interferiscano funzionalmente in modo incrociato, mostrando una competizione per un percorso di esportazione comune.⁷³ Un ruolo di RANBP1 nell'esportazione della proteina REV dell'HIV1 è stato dedotto da studi su HERC5 (HECT and RCC1-containing protein 5). HERC5 è una proteina ligasi ubiquitaria o E3, codificata negli umani dal gene *HERC5*. Questa proteina funge da ligasi per ISG15, una proteina indotta dall'interferone di tipo 1, che inibisce la replicazione di diversi virus, tra cui HIV-1, virus dell'influenza A e Papillomavirus. Inaspettatamente, HERC5 non inibisce la produzione di HIV per la sua attività ligasica, ma grazie all'analogia del suo dominio amminoterminale con quello di RCC1, avendo come bersaglio l'esportazione nucleare di RNA Rev dipendente. Questo meccanismo, dovuto all'interazione tra HERC5 e RAN, determina una riduzione dei livelli intracellulari di RANGTP e della capacità di quest'ultimo di interagire con RANBP1.⁷⁴

RANBP1 svolge anche un ruolo importante nella replicazione e metabolismo di alcuni batteri specifici. Studi sulla *Legionella pneumophila*, l'agente eziologico della legionellosi, hanno fornito una migliore comprensione del ruolo di RANBP1. La *Legionella pneumophila* usa il sistema di secrezione Icm/Dot di tipo IV (T4SS) per formare nei fagociti un distinto "vacuolo contenente *Legionella*" (LCV), che intercetta il traffico di vescicole endosomiali e secretorie. RAN e RANBP1 si localizzano nei LCV e promuovono la crescita di *L. pneumophila*. Anche la proteina di *L. pneumophila* LegG1 si accumula nei LCV. L'attivazione di RAN, da parte di LegG1, porta ad una stabilizzazione dei microtubuli, promuove la mobilità del vacuolo patogeno intracellulare e la crescita batterica, nonché la chemiotassi e la migrazione delle cellule infettate da *Legionella*.^{75,76}

1.3.4 RANBP1 nella teratogenesi e nell'infertilità

In modelli zebrafish l'mRNA di RANBP1 ha una discendenza trascrizionale materna ed è espresso ubiquitariamente in tutti gli stadi embrionali. La sovraespressione della proteina non ha mostrato alcun effetto sull'embriogenesi. Al contrario, la sottoregolazione di RANBP1, ha incrementato il tasso di mortalità e la frequenza dei difetti, raggiunti mediante inoculazione di RNA a doppio filamento, sebbene la bassa specificità di quest'ultimo non abbia pienamente confermato l'interferenza deregolatoria.⁷⁷

Nel campo dello sviluppo embrionale e della teratogenesi, è stato dimostrato che topi knock-out per *RANBP1* manifestano una vitalità inaspettata correlata con l'infertilità maschile, a causa del blocco della spermatogenesi. Al contrario, il knock-down di *RANBP2* ha causato la morte cellulare solo in embrioni derivati da topi knock-out anche per *RANBP1*, e non nei topi di controllo. Ciò indica che la simultanea deplezione di RANBP1 e RANBP2 compromette definitivamente la vitalità delle cellule germinali.⁷⁸ A questo scopo, RANBP1 potrebbe essere considerato come nuovo biomarcatore, che consente una diagnosi affidabile e non invasiva di

azoospermia. I differenti tipi di azoospermia sono: azoospermia ostruttiva e azoospermia nonostruttiva, sottotipi di ipospermatogenesi e sindrome a sole cellule Sertoli. Utilizzando un approccio di proteomica comparativa, partendo dal tessuto testicolare, sono stati identificati diversi percorsi associati all'azoospermia, e ad un certo numero di proteine specifiche del testicolo e delle cellule germinali. Tra queste proteine, RANBP1, H1-6 e TKTL2 hanno mostrato un potere clinico superiore per la discriminazione quantitativa tra azoospermia ostruttiva, sottotipi di ipospermatogenesi e sindrome a sole cellule Sertoli.⁷⁹ Complessivamente, RANBP1 emerge come un interessante target in chimica farmaceutica, poiché la sua inibizione o attivazione potrebbe condurre a risultati terapeutici promettenti. Tuttavia, fino ad oggi, non sono stati identificati modulatori di RANBP1 nella letteratura scientifica. Questo sottolinea l'importanza della ricerca in questo campo come una via promettente per lo sviluppo di nuovi farmaci.

2. PROGETTO

Il mio lavoro di tesi sperimentale si pone all'interno di una collaborazione con il gruppo di modellistica molecolare del Professor Ortuso dell'Università Magna Graecia di Catanzaro, e del gruppo di genetica medica del Professor Amato sempre presso l'Università Magna Graecia di Catanzaro. Partendo dalla struttura ai raggi X del complesso RAN-RANBP1-RANGAP,⁸⁰ (Figura 7A), il gruppo del Professor Ortuso ha condotto studi *in silico* su RANBP1.

L'obiettivo è stato quello di profilare in modo completo tutte le potenziali tasche di legame all'interno di questa proteina e poi identificare una collezione di promettenti modulatori, ponendo le basi per potenziali applicazioni cliniche di questi composti. Nonostante siano state identificate tre tasche, studi di dinamica molecolare hanno suggerito che il dominio terminale di RANBP1 si piega sulla tasca 2, rendendola inaccessibile per il legame con le molecole, (Figura 7B). Per questo motivo, solo le tasche 1 e 3 sono state prese in considerazione per gli studi di docking e di dinamica molecolare al fine di identificare potenziali ligandi.

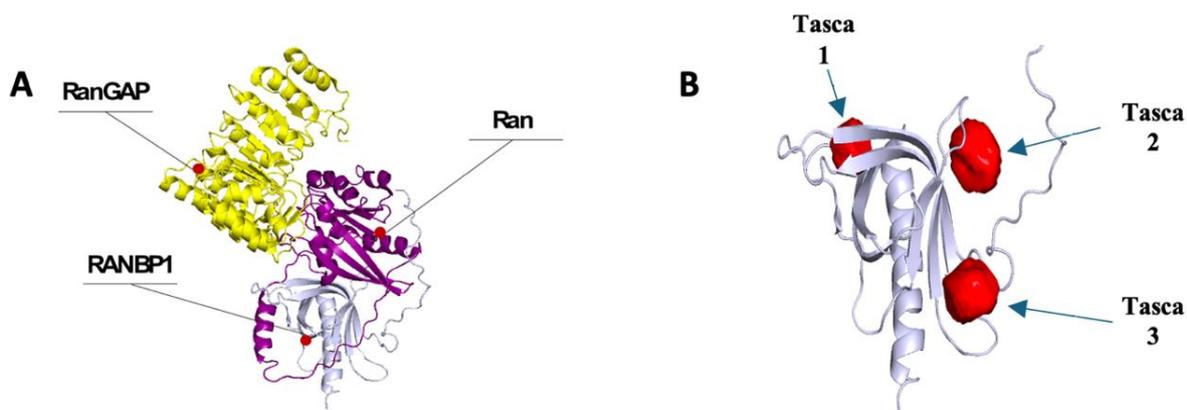
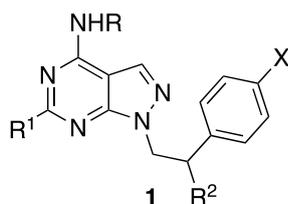


Figure 7. A. Struttura del cristallo del complesso RAN (viola) RANBP1 (viola chiaro) RAN-GAP1 (giallo). (Codice PDB: 1K5G). B. Le tre tasche di RANBP1 (rosse) rilevate con lo strumento Flapsite. Le frecce indicano le tasche di interesse.

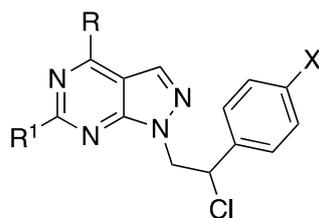
Il gruppo di ricerca, in cui ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale, ha sintetizzato un'ampia libreria di composti a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica, quali inibitori ATP competitivi delle tirosina chinasi citoplasmatiche Src e Abl.⁸¹⁻⁸⁴



NHR= gruppi amminici alifatici e aromatici
 R¹= H, SCH₃, SC₂H₅, S-nC₃H₇
 R²= H, CH₃, Cl
 X= H, F, Cl, Br

Partendo dalla consolidata collaborazione con i gruppi dell'Università di Catanzaro, la libreria interna di oltre quattrocento derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici, ampliata con altri derivati progettati razionalmente, è stata vagliata per selezionare i migliori composti per l'interazione con RANBP1. Questo studio ha portato alla selezione dei migliori 10 ligandi per le tasche 1 (**Tabella 1**) e 3 (**Tabella 2**).

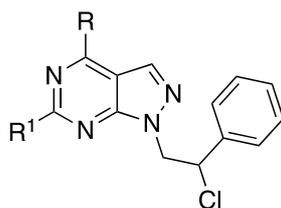
Tabella 1. Migliori 10 composti per la tasca 1 secondo gli studi di docking.



Posizione	composto ^a	R	R ¹	X	Energia di legame (kcal/mol)
#1	SI174_S	NHC ₆ H ₄ - <i>m</i> Cl	SC ₄ H ₉	H	-39.094
#2	SI99_S	NHCH ₂ C ₆ H ₅	SC ₃ H ₇	H	-37.733
#3	SI173_S	NHC ₆ H ₄ - <i>m</i> F	SC ₄ H ₉	H	-37.592
#4	S32_S	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ - <i>m</i> Cl	H	H	-37.476
#5	SI175_S	NHCH ₂ C ₆ H ₅	SC ₄ H ₉	H	-37.131
#6	SI148_RS	NHC ₆ H ₄ - <i>m</i> Cl	S-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	H	-36.456
#7	SI110_S	NHCH ₂ C ₆ H ₅	SCH ₂ CH ₂ -4morfolina	H	-36.220
#8	SI176_R	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	SC ₄ H ₉	H	-35.855
#9	SI69_S	4-morfolina	SCH ₃	Cl	-35.744
#10	SI146_RR	NHCH ₂ C ₆ H ₅	S-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	H	-35.707

^aPer i composti è riportata la configurazione del/i centro/i chirale/i della molecola selezionata.

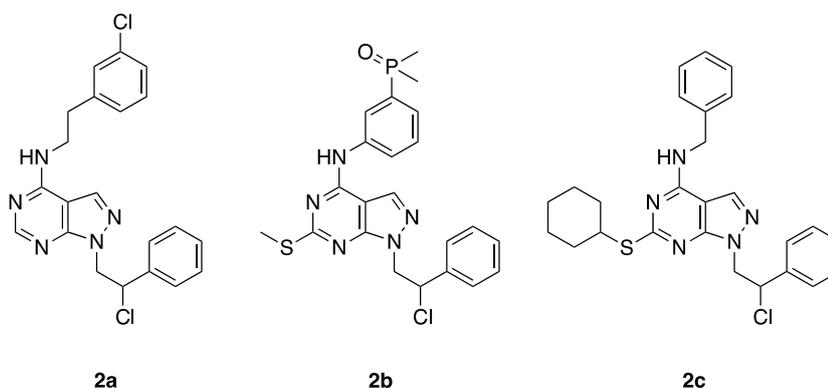
Tabella 2. Migliori 10 composti per la tasca 3 secondo gli studi di docking.



Posizione	composto ^a	R	R ¹	Energia di legame (kcal/mol)
#1	SI181_S	NHC ₆ H ₄ - <i>m</i> Cl	SCH ₂ CH ₂ -4morfolina	-43.133
#2	SI151_S	NHCH ₂ C ₆ H ₅	S-cicloesile	-41.293
#3	SI61_S	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ - <i>p</i> OCH ₃	SCH ₃	-39.798
#4	SI147_SS	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	S-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-39.763
#5	SI185_S	NHC ₆ H ₄ - <i>m</i> PO(CH ₃) ₂	SCH ₃	-39.689
#6	SI147_RS	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	S-CH(CH ₃)C ₂ H ₅	-39.483
#7	SI176_S	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	SC ₄ H ₉	-39.391
#8	SI175_R	NHCH ₂ C ₆ H ₅	SC ₄ H ₉	-39.386
#9	SI57_R	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₄ - <i>p</i> Cl	SCH ₃	-39.324
#10	SI152_R	NHCH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	S-cicloesile	-39.264

^aPer i composti è riportata la configurazione del/i centro/i chirale/i della molecola selezionata.

In questo contesto, il mio lavoro sperimentale si è focalizzato sulla e purificazione dei composti finali già pubblicati dal gruppo e sulla sintesi dei nuovi derivati S32, SI185 e SI151, chiamati rispettivamente nella tesi **2a**, **2b** e **2c**.



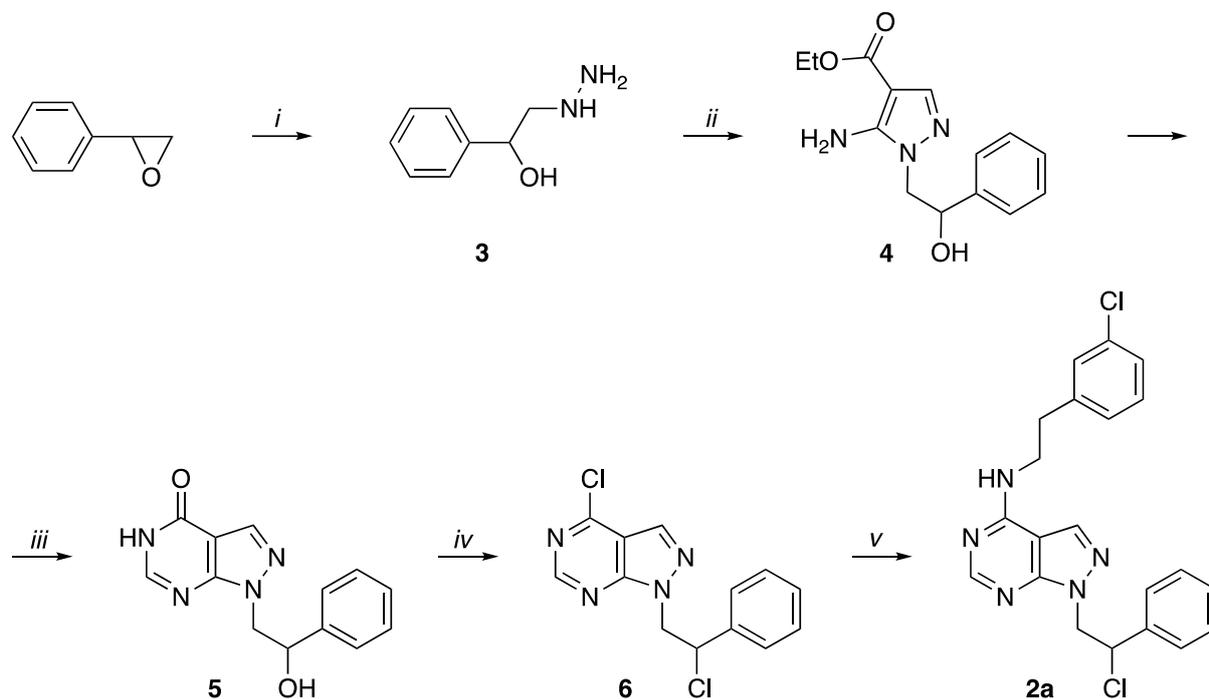
In questa prima fase, i composti sono stati sintetizzati e inviati come miscela racemica.

3. DISCUSSIONE

3.1 CHIMICA

Per la sintesi dei composti **2a-c** si è seguito un approccio sintetico multistep, che ha come intermedio chiave il composto **4**. Per la sintesi del composto **2a**, si fa reagire l'ossido di stirene con idrazina monoidrata ottenendo l'1-fenil-2-idrazinoetano **3**; questo viene trattato con etossimetilencianoacetato di etile a 80 °C per 8 ore, portando alla formazione del 5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **4**. Il trattamento di questo ultimo con un eccesso di formammide a riflusso per 8 ore porta alla formazione dell'intermedio 1-(2-feniletil-2-idrossi)1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **5** con buona resa. La successiva clorurazione con il complesso di Vilsmeier, preparato da ossicloruro di fosforo e dimetilformammide (DMF) anidra in quantità equimolecolari, porta al derivato 4-cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinico **6** clorurato sia sulla catena dell'*N*1 pirazolico, sia sulla posizione 4 dell'anello pirimidinico. Infine, la reazione dell'intermedio **6** con la 2-(3-clorofenil)etil-1-ammina in toluene anidro a temperatura ambiente per 36 ore porta al composto **2a** con buona resa (**Schema 1**).

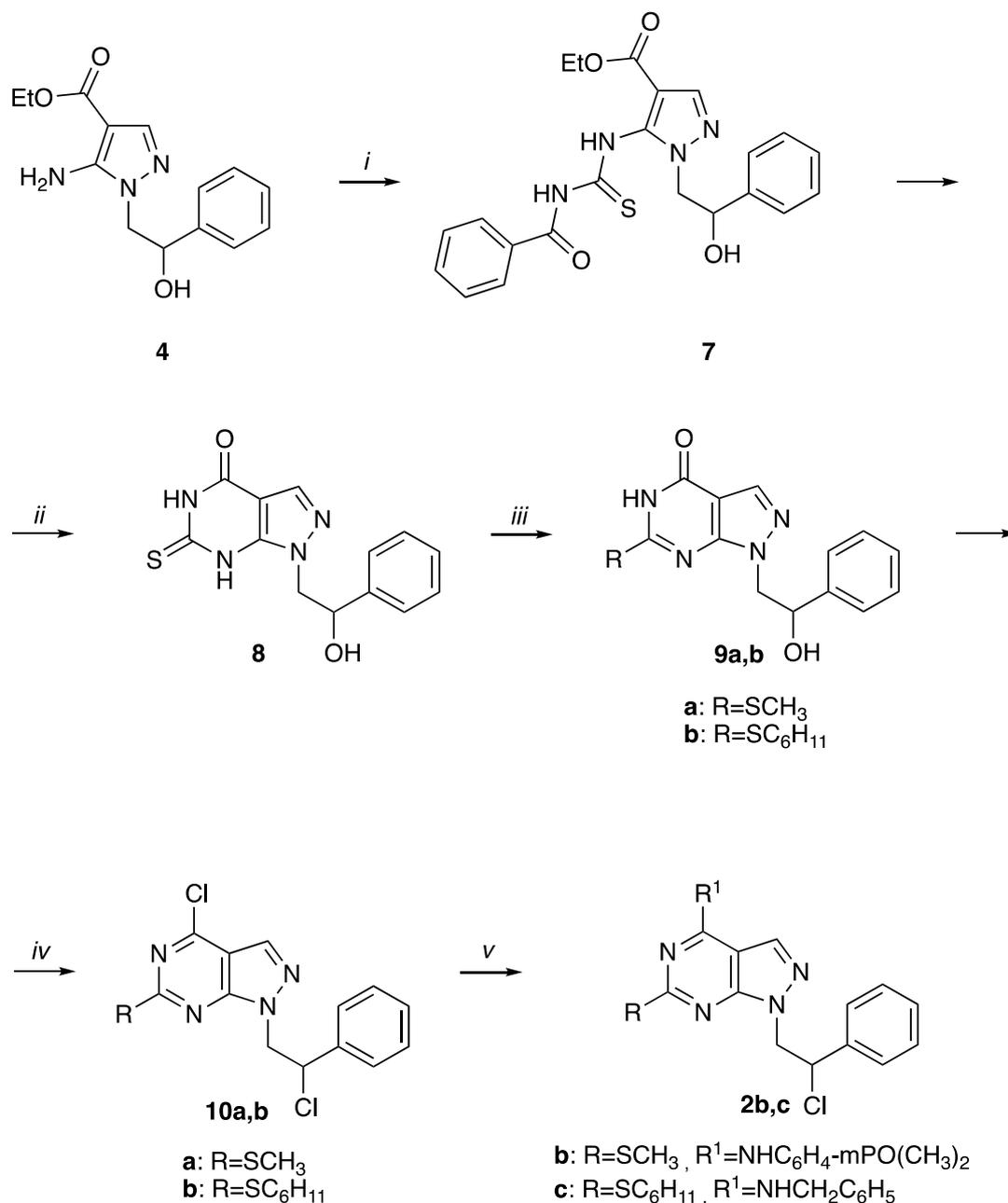
Schema 1. Sintesi del composto 2a.^a



^aReagenti e condizioni. (i) idrazina monoidrata, 100 °C, 30 min, 82%; (ii) etossimetilencianoacetato di etile, toluene anidro, 80 °C, 8h, 80%; (iii) formammide, 190 °C, 8h, 70%; (iv) POCl₃/DMF (1:1), CHCl₃, riflusso, 12h, 98%; (v) 2-(3-clorofenil)etil-1-ammina, toluene anidro, t.a, 36h, 61%.

Per ottenere i composti **2b,c**, l'intermedio **4** è fatto reagire con benzoilisotiocianato in tetraidrofurano (THF) anidro a refluxo per 8 ore, portando alla formazione del 5-[[[(benzoilammino)carbonotionil]ammino]-1-(2-fenil-2-idrossietil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **7**, ciclizzato mediante trattamento con NaOH 2M a refluxo per 10 minuti, seguito da acidificazione con acido acetico glaciale per ottenere l'1-(2-fenil-2-idrossietil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **8**. Il composto **8** è alchilato sull'atomo di zolfo in C6 mediante due diverse procedure in base che si voglia ottenere il derivativo tiometilico **9a** o il derivato tiocicloesilico **9b**. Per reazione di **8** con ioduro di metile a refluxo per 12 ore in THF anidro, si ottiene **9a**, mentre per reazione con bromuro di cicloesile, K₂CO₃ anidro in DMF anidra a 80 °C per 15 ore si ottiene il derivato **9b**. I derivati **9a,b** a loro volta vengono trattati con il complesso di Vilsmeier, in CHCl₃ anidro a refluxo per 8 ore ottenendo i derivati 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(cicloalchiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici **10a,b**. Infine per reazione di **10a** con 3-(dimetilfosforil)anilina in etanolo assoluto, a refluxo per 5 ore si ottiene il composto **2b**, mentre per reazione di **10b** con benzilammina in toluene a temperatura ambiente per 24 ore si ottiene il composto **2c** (**Schema 2**).

Schema 2. Sintesi dei composti **2b,c**.^a



^a**Reagenti e condizioni.** (i) benzoilisotiocianato, THF an, riflusso, 8h, 96%; (ii) NaOH 2M, riflusso per 20 min, H₂O, acido acetico glaciale, 63%; (iii) CH₃I, THF an, riflusso, 12h, 85%, per ottenere **9a**; cicloesilbromuro, K₂CO₃ an, DMF an, 80 °C, 15h, 48%, per ottenere **9b**; (iv) POCl₃/DMF (1:1), CHCl₃ an, riflusso, 8h, 86-88%; (v) 3-(dimetilfosforil)anilina, EtOH ass, riflusso, 5h, per ottenere **2b**, 51%; benzilammina, in toluene, t.a, 24h, per ottenere **2c**, 48%.

3.2 BIOLOGIA

Tutti i composti suggeriti dagli studi di modellizzazione molecolare sono stati inviati al gruppo del Professor Amato presso l'Università Magna Greacia di Catanzaro per valutarne l'attività biologica.

Ad oggi, sette di questi composti, in particolare SI99, S32 (**2a**) e SI110 (candidati ligandi per la tasca 1), SI151 (**2c**), SI175 e SI152 (candidati ligandi per la tasca 3) e SI176 (candidato ligando per le tasche 1 e 3), sono stati valutati in un test di citotossicità sulla linea cellulare Jurkat, una linea di linfoblasti immortalizzati, utilizzata per lo studio della leucemia acuta a cellule T *in vitro*.

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una densità di 5×10^3 cellule per pozzetto e successivamente sono state incubate con diverse concentrazioni delle sostanze da testare: 10 nM, 100 nM, 1 μ M e 10 μ M per 72h. Tutti i test sono stati eseguiti in triplicato e i risultati sono stati espressi come media \pm deviazioni standard (SD).

Dai primi saggi preliminari eseguiti sulla linea cellulare Jurkat, si è potuto osservare che queste molecole inducono una riduzione della vitalità cellulare (**Figura 8**).

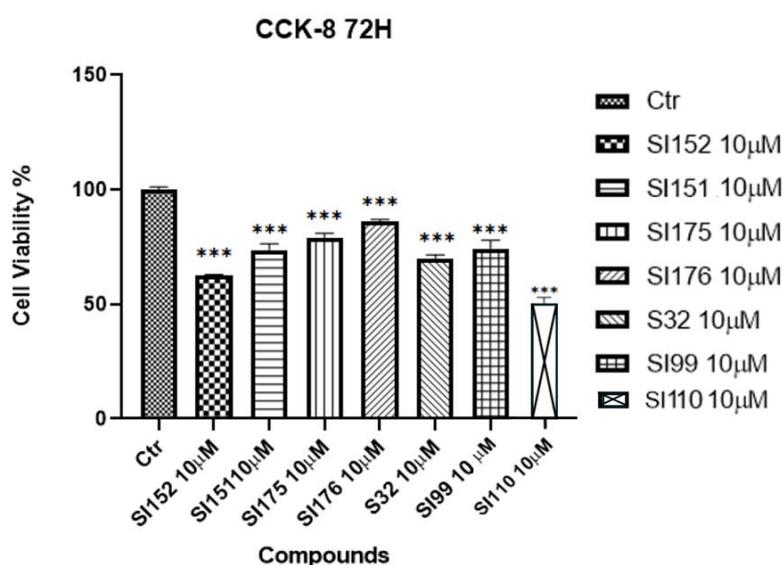


Figura 8. Saggio di vitalità cellulare sulle cellule Jurkat per le molecole SI152, SI151, SI175, SI176, S32, SI99 e SI110 alla concentrazione di 10 μ M. La vitalità è stata determinata a 72 h di incubazione. I dati sono presentati come deviazione standard derivante da tre esperimenti indipendenti. *** $p < 0,001$.

In particolare, SI151 (**2c**), SI110 e SI152 sono risultati i composti più promettenti, determinando una riduzione della vitalità cellulare già alla concentrazione di 10 nM. In dettaglio, SI151 e SI110 possiedono la maggiore azione citotossica, determinando una riduzione della vitalità cellulare rispettivamente del 50 e del 40% (**Figure 9A,B**), mentre SI152, ha mostrato una minore, anche se significativa, attività (**Figura 9C**).

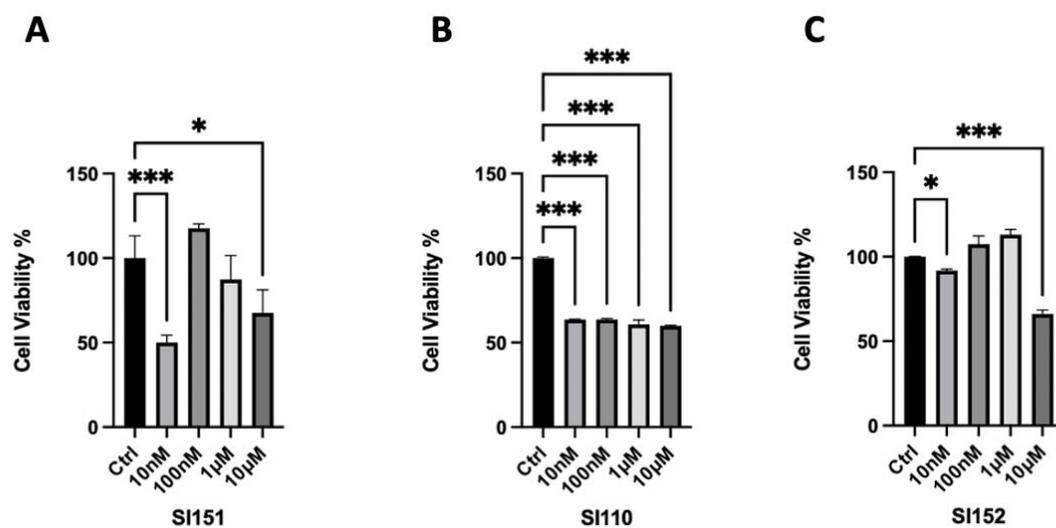


Figura 9. Saggio di vitalità cellulare sulle cellule Jurkat per le molecole SI151 (**A**), SI110 (**B**) e SI152 (**C**) a diverse concentrazioni (10 nM, 100 nM, 1 µM e 10 µM). La vitalità è stata determinata a 72 h di incubazione. * p 0,01 e *** p < 0,001.

4. CONCLUSIONI

RANBP1 è un enzima che sembra essere coinvolto nell'insorgenza e nello sviluppo di molte neoplasie. Tuttavia, non vi sono ancora ligandi di RANBP1 riportati in letteratura, per cui la ricerca di inibitori rappresenta un campo con grandi potenzialità per la terapia antitumorale.

In questo contesto, il mio lavoro sperimentale si è focalizzato sulla sintesi di nuovi composti a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica quali potenziali inibitori di RANBP1. In particolare, partendo da uno studio di modeling effettuato dal Gruppo del Prof. Ortuso, mi sono occupata della ripreparazione e purificazione di alcuni derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici già pubblicati dal gruppo di ricerca dove ho svolto il lavoro di tesi e della sintesi di alcuni nuovi analoghi, S32, SI185 e SI151, chiamati rispettivamente **2a**, **2b** e **2c**.

I composti sono stati inviati al gruppo del Prof. Amato per la valutazione biologica. E' interessante notare che tutti i composti al momento testati inducono una riduzione della vitalità cellulare in un saggio preliminare condotto sulle cellule Jurkat. In particolare, SI151 (**2c**), SI110 e SI152 sono risultati i più attivi, determinando una significativa riduzione della vitalità cellulare già alla concentrazione di 10 nM. Per il composto **2b** siamo in attesa dei risultati.

I composti più promettenti verranno sottoposti a saggi specifici *in vitro* per valutare la loro attività come inibitori di RANBP1.

Sulla base dell'attività che mostreranno questi composti, si orienteranno le sintesi future, al fine di ottenere inibitori di RANBP1 dotati di un'attività maggiore e un buon profilo farmacocinetico.

5. PARTE SPERIMENTALE

I punti di fusione sono stati determinati con Buchi B-540.

Gli spettri di potassio (KBr), mediante uno spettrofotometro Perkin-Elmer 398.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati con un apparecchio Varian Gemini 200 (200 MHz) oppure con un Bruker Avance DPX400 (400 MHz), oppure con un JEOL JNM ECZ-400S/L1 FT (400 MHz); i chemical shifts sono riportati in δ (ppm) usando come standard interno il tetrametilsilano (TMS); le J sono espresse in hertz (Hz). L'accoppiamento protonico è stato descritto usando le seguenti abbreviazioni: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, m = multipletto, s all = s allargato. Gli spettri sono stati registrati in cloroformio deuterato (CDCl_3) o dimetilsolfossido deuterato (DMSO-d_6).

Tutti i composti sono stati analizzati per C, H, N con un analizzatore elementare Thermo Scientific Flash 2000; i risultati analitici sono compresi nell'intervallo $\pm 0.4\%$ rispetto ai valori teorici.

La purificazione per cromatografia è stata eseguita in colonna impaccata con gel di silice 60 Å, con particelle delle dimensioni di 220-440 mesh, o con Florisil, dimensioni delle particelle 100-200 mesh o con cartuccia Biotage[®] SNAP Ultra impaccata con Biotage[®] HP-Sphere[™].

I composti sono riportati secondo l'ordine con cui compaiono nei due schemi di sintesi.

Sintesi dell'1-fenil-2-idrazinoetano 3

All'idrazina monoidrata (30 mL, 600 mmol) preriscaldata a 100 °C si aggiunge goccia a goccia l'ossido di stirene (20 mL, 170 mmol), mantenendo a riflusso per 30 minuti. L'eccesso di idrazina si allontana a pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene distillato con una pompa ad olio.

Resa: 82% (olio giallo)

P.e.: 155-158 °C/0.6 mmHg

PM: 152.20

Sintesi del 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile 4

Ad una soluzione di etossimetilencianoacetato di etile (3.38 g, 20 mmol) in toluene anidro (20 mL) viene aggiunto 1-fenil-2-idrazinoetano **3** (3.04 g, 20 mmol). La soluzione così ottenuta viene scaldata a 80 °C per 8 ore. Dopo raffreddamento si svapora il solvente a circa metà volume e si lascia cristallizzare. Si ottiene un solido bianco che viene filtrato e ricristallizzato da toluene.

Resa: 80%

P.f. 136-137 °C

Analisi elementare per C₁₄H₁₇N₃O₃

PM = 275.31

	C%	H%	N%
Calcolato	61.08	6.22	15.26
Trovato	61.07	6.22	15.31

IR (cm⁻¹): 3470, 3330 (NH₂), 3300-3000 (OH), 1685 (CO).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.01-4.23 (m, 4H, CH₂N + CH₂O), 4.92-5.05 (m, 1H, CHO), 5.71 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 6.15 (s, 2H, NH₂), 7.28-7.49 (m, 6H, 5H Ar + H-3).

Sintesi del 1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one 5

Una sospensione del 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **4** (8.53 g, 31 mmol) in formammide (15 g, 330 mmol) viene scaldata a 190 °C per 8 ore. Dopo raffreddamento, la miscela di reazione viene versata in acqua (300 mL). Il solido formatosi viene filtrato, lavato con acqua, sciolto in NaOH 2M e fatto bollire con carbone attivo per circa 10 minuti.

Dopo filtrazione su doppio filtro di carta a pieghe per eliminare il carbone, la soluzione ottenuta viene acidificata fino a pH 4 con acido acetico glaciale. Si ottiene un solido bianco che viene filtrato, lavato con acqua e ricristallizzato da etanolo assoluto.

Resa: 70%

P.f. 270-271 °C (dec)

Analisi elementare per C₁₃H₁₂N₄O₂

PM = 256.27

	C%	H%	N%
Calcolato	60.93	4.72	21.86
Trovato	60.75	4.45	22.00

IR (cm⁻¹): 3400 (NH), 3245-2900 (OH), 1740 (CO).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 4.25-4.55 (m, 2H, CH₂), 5.05-5.15 (m, 1H, CHO), 5.65 (d, 1H, OH, scompare con D₂O), 7.25-7.45 (m, 5H Ar), 8.05 (s, 1H, H-3), 8.10 (s, 1H, H-6), 12.15 (s all, 1H, NH, scompare con D₂O).

Sintesi della 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina 6

Il complesso di Vilsmeier, precedentemente preparato da POCl₃ (15.33 g, 100 mmol) e DMF anidra (7.31 g, 100 mmol), viene aggiunto ad una sospensione di 1-(2-fenilettil-2-idrossi)1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **5** (2.56 g, 10 mmol) in CHCl₃ (50 mL). La miscela di reazione viene quindi scaldata a riflusso per 12h. Dopo raffreddamento, la miscela viene lavata con acqua (2 x 20 mL), seccata (MgSO₄), filtrata e concentrata sotto vuoto. Si ottiene un olio che viene purificato tramite colonna cromatografica (Florisil, 100-200 mesh), usando etere dietilico come eluente. L'olio ottenuto cristallizza per aggiunta di una soluzione di etere dietilico/petroletere (bp: 40-60 °C) 1:1.

Resa: 75%

P.f. 105-106 °C

Analisi elementare per C₁₃H₁₀N₄Cl₂

PM = 293.15

	C%	H%	N%
Calcolato	53.26	3.44	19.11
Trovato	53.42	3.50	19.27

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 4.78-4.97 e 5.02-5.18 (m, 2H, CH₂), 5.50-5.59 (m, 1H, CHCl), 7.25-7.48 (m, 5H Ar), 8.18 (s, 1H, H-3), 8.75 (s, 1H, H-6).

Sintesi del 5-[[benzoilammino]carbonotionil]ammino]-1-(2-fenil-2-idrossietil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **7**

Una soluzione di 5-ammino-1-(2-fenil-2-idrossietile)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **4** (4.13 g, 15.0 mmol) e benzoilisotiocianato (2.4 mL, 16.5 mmol) in THF anidro (30 mL) si lascia a riflusso per 8 ore. Successivamente il solvente si allontana a pressione ridotta.

Il grezzo viene cristallizzato come un solido bianco con l'aggiunta di etere dietilico (30 mL).

Resa: 96%

P.f.: 170-172 °C

Analisi elementare per C₂₂H₂₂SN₄O₄

PM = 438.50

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	60.26	5.06	12.78	7.31
Trovato	60.22	5.20	12.95	7.04

IR (cm⁻¹): 3221 (NH), 3190-2940 (OH), 1708 (COOEt), 1671 (C=O)

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.13-4.20 (m, 5H, CH₂N + CH₂O + OH), 4.91-5.03 (m, 1H, CHO), 7.29-7.33 e 7.54-7.71 (2m, 8H Ar), 7.94 (s, 1H, H-3), 8.02-8.06 (m, 2H Ar), 12.12 (s, 1H, NH), 12.21 (s, 1H, NH).

Sintesi dell'1-(2-fenil-2-idrossietil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **8**

Una soluzione del 5-[[benzoilammino]carbonotionil]ammino}-1-(2-fenil-2-idrossietil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **7** (6.14 g, 14 mmol) in NaOH 2M acquoso (60 mL) viene fatta bollire per 10 minuti e poi viene diluita con acqua (40 mL), scaldando per ulteriori 10 minuti.

La soluzione viene quindi acidificata con acido acetico glaciale, raffreddando in un bagno di ghiaccio. Si lascia a riposo per 12 ore in frigorifero. Il solido cristallizzato viene filtrato e ricristallizzato da etanolo assoluto per ottenere **8** come un solido bianco.

Resa: 63%

P.f.: 263-265 °C

Analisi elementare per C₁₃H₁₂SN₄O₂

PM = 288.33

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	54.16	4.20	19.43	11.12
Trovato	54.28	4.27	19.70	11.03

IR (cm⁻¹): 3362 (NH), 3142-2773 (OH), 1681 (C=O).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 4.19-4.27 e 4.59-4.70 (2m, 2H, CH₂N), 4.90-4.95 (m, 1H, CHO), 5.66 (s all, 1H, OH), 7.27-7.47 (m, 5H Ar), 7.99 (s, 1H, H-3), 12.19 (s, 1H, NH), 13.40 (s all, 1H, NH).

Sintesi dell'1-(2-fenil-2-idrossietil)-6-(metiltio)-1,5-diidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one 9a

Una soluzione di 1-(2-fenil-2-idrossietil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **8** (1.99 g, 6.9 mmol) e CH₃I (3.0 mL, 48.6 mmol) in THF anidro (150 mL) viene scaldata a riflusso per 12 ore. Il solvente viene evaporato a pressione ridotta.

Il grezzo così ottenuto cristallizza mediante l'aggiunta di etere dietilico (50 mL).

Resa: 85%

P.f.: 208-209 °C

Analisi elementare per C₁₄H₁₄SN₄O₂

PM = 302.35

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	55.62	4.67	18.53	10.60
Trovato	55.46	4.34	18.71	10.31

IR (cm⁻¹): 3544 (NH), 1678 (C=O).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.42 (s, 3H, SCH₃), 4.17-4.30 (m, 2H, CH₂N), 4.90-5.05 (m, 1H, CHO), 5.50 (s, 1H, OH), 7.03-7.31 (m, 5H Ar), 8.04 (s, 1H, H-3), 12.85 (s all, 1H, NH).

Sintesi del 6-(cicloesiltilio)-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1,7diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one 9b

Una soluzione di 1-(2-idrossi-2-feniletil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **8** (2.88 g, 10 mmol), bromuro di cicloesile (1.65g, 10.14 mmol) e K₂CO₃ anidro (1.38 g, 10 mmol) in DMF anidra (10mL) viene scaldata a 80 °C per 15 ore. La miscela viene versata in H₂O fredda, il solido bianco viene filtrato, lavato con H₂O, e ricristallizzato mediante da EtOH assoluto.

Resa: 48%

P.f.: 226-227 °C

Analisi elementare per C₁₉H₂₂SCl₂O₂

PM: 370.47

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	61.60	5.99	15.12	8.65
Trovato	61.56	6.05	15.11	8.36

IR (cm⁻¹): 3315 (NH), 2930 (OH), 1704 (C=O) cm⁻¹.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.30-1.85 (m, 10H, 5CH₂), 3.89-3.99 (m, 1H, SCH), 4.20-4.39 (m, 2H, CH₂N), 5.00-5.22 (m, 1H, CHOH), 5.60 (d, 1H, OH scompare con D₂O), 7.10-7.40 (m, 5H Ar), 7.90 (s, 1H, H-3), 12.22 (s all, 1H, NH scompare con D₂O).

Procedura generale per la sintesi dei derivati 4-cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(cicloalchiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici 10a,b

Il complesso di Vilsmeier, precedentemente preparato da POCl₃ (8.0 mmol per il composto **10a** e 20 mmol per ottenere il composto **10b**) e dimetilformammide anidra (DMF) (8.0 mmol per il composto **10a** e 20 mmol per ottenere il composto **10b**) si aggiunge ad una sospensione di **9a,b** (2.0 mmol) in CHCl₃ anidro (15 mL). La soluzione viene lasciata a riflusso per 8 ore. Poi viene lavata con acqua (2 x 20 mL), essiccata (MgSO₄), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il composto **9a** viene purificato mediante cromatografia flash, usando lo strumento Isolera™ One Biotage, (cartuccia Biotage® SNAP Ultra impaccata con Biotage® HP-Sphere™), utilizzando come eluente una miscela di etere di petrolio (punto di ebollizione 40-60 °C)/etere dietilico (9:1), per ottenere il prodotto puro come un solido bianco. Il composto **9b** viene purificato mediante cromatografia (Florisil, 100-200 mesh) usando Et₂O come eluente, ottenendo il prodotto puro come solido bianco.

4-Cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(metiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina 10a

Resa: 88%

P.f.: 95-96 °C

Analisi elementare per C₁₄H₁₂SN₄Cl₂

PM = 339.24

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	49.57	3.57	16.52	9.45
Trovato	49.92	3.44	16.89	9.40

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.63 (s, 3H, SCH₃), 4.85-5.12 (m, 2H, CH₂N), 5.70 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, CHCl), 7.35-7.37 e 7.50-7.52 (2m, 5H Ar), 8.41 (s, 1H, H-3).

4-Cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(cicloesiltio)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina 10b

Resa: 86%

P.f.: 77-78 °C

Analisi elementare per $C_{19}H_{20}SN_4Cl_2$

PM: 407.36

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	56.02	4.95	13.75	7.87
Trovato	56.31	4.90	13.90	7.85

1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.32-1.82 (m, 10H, 5CH₂ cicloesile), 3.87 -3.98 (m, 1H, SCH), 4.54-4.62 e 4.64-4.84 (2m, 2H, CH₂N), 5.25-5.35 (m, 1H, CHCl), 7.21-7.38 (m, 5H, Ar), 7.72 (s, 1H, H-3).

Procedura generale per la sintesi dei derivati 1-(2-cloro-2-feniletil)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-amminici 2a e 2c

Ad una soluzione dell'opportuno intermedio clorurato **6 e 10b** (1 mmol) in toluene anidro (5 mL), viene aggiunta l'opportuna ammina (4 mmol); la soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 24-36 ore. La miscela di reazione viene lavata con H₂O (2 x 10 mL) e la fase toluenica viene seccata su MgSO₄, filtrata ed evaporata a pressione ridotta; l'olio residuo ottenuto cristallizza per aggiunta di una miscela di etere dietilico/petroletere (p.e. 40-60 °C) (1:1) per dare i relativi prodotti 4-ammino sostituiti **2a,c**, purificati mediante ricristallizzazione da etanolo assoluto.

1-(2-Cloro-2-feniletil)-*N*-(3-clorofenetil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 2a

Resa: 61%

P.f. 107-108.0 °C

Analisi elementare per C₂₁H₁₉N₅Cl₂

PM = 412.32

	C%	H%	N%
Calcolato	61.17	4.64	16.99
Trovato	61.51	4.61	17.30

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.90 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂Ph), 3.69 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N), 4.71-4.76 e 4.88-4.94 (2m, 2H, CH₂N), 5.61-5.64 (m, 1H, CHCl), 7.16-7.35 (m, 7H Ar), 7.43-7.48 (m, 2H Ar), 8.08 (s, 1H, H-3), 8.25 (s, 1H, H-6), 8.35 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH).

***N*-Benzil-1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(cicloesiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 2c**

Resa: 48%

P.f. 127-128 °C

Analisi elementare per C₂₆H₂₈SN₅Cl

PM = 478.06

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	65.32	5.90	14.65	6.71
Trovato	65.64	5.79	14.04	6.41

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1.23-1.19 (m, 1H, cicloesile), 1.32-1.39 (m, 4H, cicloesile), 1.54-1.57 (m, 1H, cicloesile), 1.66-1.68 (m, 2H cicloesile), 1.99-2.02 (m, 2H cicloesile), 3.66 (m, 1H, SCH), 4.64-4.71 (m, 3H, 1H CH₂N + 2H CH₂N), 4.80-4.83 (m, 1H, CH₂N), 5.58-5.61 (m, 1H, CHCl), 7.19-7.25 (m, 1H Ar), 7.29-7.36 (m, 7H Ar), 7.45 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H Ar), 8.03 (s, 1H, H-3), 8.77 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH).

Sintesi dell'(3-((1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(metiltio)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il)ammino)fenil)dimetilfosfina ossido 2b

Ad una soluzione di 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(metiltio)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina **10a** (0.34 g, 1.0 mmol) in etanolo assoluto (5 mL) viene aggiunto 3-(dimetilfosforil)anilina (0.61 mL, 4 mmol) e la reazione viene scaldata a riflusso per 5 ore.

Dopo raffreddamento il solvente viene evaporato a pressione ridotta e il grezzo ripreso con H₂O (20 mL), quindi estratto con CH₂Cl₂ (20 mL); la fase organica viene lavata con H₂O (20 mL), essiccata su MgSO₄ e concentrata a pressione ridotta.

Si ottiene un olio che, lasciato in freezer, cristallizza per aggiunta di una miscela di etere dietilico/petroletere (p.e. 40-60 °C) (1:1) e viene ulteriormente purificato mediante ricristallizzazione da etanolo assoluto.

Resa: 51%

P.f.: 195-196 °C

Analisi elementare per C₂₂H₂₃PSN₅ClO

PM = 471.94

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	55.99	4.91	14.84	6.79
Trovato	55.83	5.08	14.43	7.02

IR (cm⁻¹): 3289 (NH) cm⁻¹.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 1.64 (s, 3H, CH₃), 1.65 (s, 3H, CH₃), 2.54 (s, 3H, SCH₃), 4.80-4.84 e 4.70-4.74 (2m, 2H, CH₂N), 5.45-5.47 (m, 1H, CHCl), 7.11-7.24 (m, 4H Ar), 7.34-7.37 (m, 3H Ar), 8.16-8.182 (m, 2H Ar), 8.40 (s, 1H, H-3), 9.87 (s all, 1H, NH).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Audia, S.; Brescia, C.; Dattilo, V.; D'Antona, L.; Cavano, P.; Iuliano, R.; Trapasso, F.; Perrotti, N.; Amato, R.; RANBP1 (RAN Binding Protein 1): The Missing Genetic Piece in Cancer Pathophysiology and Other Complex Diseases. *Cancers* **2023**, *15*, 486.
2. Gene: RANBP1 (ENSG00000099901)-Summary-Homo_sapiens-GRCh37 Archive Browser 108. Available online: https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000099901;r=22:20103461-20114878 (accessed on 9 November 2022).
3. RANBP1 Gene-GeneCards | RANG Protein | RANG Antibody. Available online: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RANBP1&keywords=RANBP1> (accessed on 9 November 2022).
4. RANBP1-Ran-Specific GTPase-Activating Protein-Homo Sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt. Available online: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P43487/entry#P43487-1> (accessed on 9 November 2022).
5. RANBP1 RAN Binding Protein 1 [Homo Sapiens (Human)]-Gene-NCBI. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5902> (accessed on 8 November 2022).
6. Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Proteomics. Tissue-Based Map of the Human Proteome. *Science* **2015**, *347*, 1260419.
7. Thul, P.J.; Akesson, L.; Wiking, M.; Mahdessian, D.; Geladaki, A.; Ait Blal, H.; Alm, T.; Asplund, A.; Björk, L.; Breckels, L.M.; et al. A Subcellular Map of the Human Proteome. *Science* **2017**, *356*, eaal3321.

8. Uhlen, M.; Karlsson, M.J.; Zhong, W.; Tebani, A.; Pou, C.; Mikes, J.; Lakshmikanth, T.; Forsström, B.; Edfors, F.; Odeberg, J.; et al. A Genome-Wide Transcriptomic Analysis of Protein-Coding Genes in Human Blood Cells. *Science* **2019**, *366*, eaax9198.
9. Sjöstedt, E.; Zhong, W.; Fagerberg, L.; Karlsson, M.; Mitsios, N.; Adori, C.; Oksvold, P.; Edfors, F.; Limiszewska, A.; Hikmet, F.; et al. An Atlas of the Protein-Coding Genes in the Human, Pig, and Mouse Brain. *Science* **2020**, *367*, eaay5947.
10. Yudin, D.; Fainzilber, M. Ran on Tracks-Cytoplasmic Roles for a Nuclear Regulator. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 587–593.
11. Rush, M.G.; Drivas, G.; D'Eustachio, P. The small nuclear GTPase Ran: how much does it run? *Bioessays*. **1996**, *18*, 103-112.
12. Plafker, K.; Macara, I.G. Facilitated Nucleocytoplasmic Shuttling of the Ran Binding Protein RanBP1. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 3510–3521.
13. Li, H.Y.; Ng, W.P.; Wong, C.H.; Iglesias, P.A.; Zheng, Y. Coordination of Chromosome Alignment and Mitotic Progression by the Chromosome-Based Ran Signal. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1886–1895.
14. Hayashi, N.; Yokoyama, N.; Seki, T.; Azuma, Y.; Ohba, T.; Nishimoto, T. RanBP1, a Ras like Nuclear G Protein Binding to Ran/TC4, Inhibits RCC1 via Ran/TC4. *Mol. Gen. Genet.* **1995**, *247*, 661–669.
15. Bischoff, F.R.; Krebber, H.; Smirnova, E.; Dong, W.; Ponstingl, H. Co-Activation of RanGTPase and Inhibition of GTP Dissociation by Ran-GTP Binding Protein RanBP1. *EMBO J.* **1995**, *14*, 705–715.
16. Lavia, P.; Macleod, D.; Bird, A. Coincident Start Sites for Divergent Transcripts at a Randomly Selected CpG-Rich Island of Mouse. *EMBO J.* **1987**, *6*, 2773–2779.

17. Gorlich, D.; Kostkat, S.; Kraftt, R.; Dingwall, C.; Laskey, R.A.; Hartmannt, E.; Prehn, S. Two Different Subunits of Importin Cooperate to Recognize Nuclear Localization Signals and Bind Them to the Nuclear Envelope. *Curr. Biol.* **1995**, *5*, 383–392.
18. Chi, N.C.; Adam, E.J.H.; Visser, G.D.; Adam, S.A. RanBP1 Stabilizes the Interaction of Ran with P97 in Nuclear Protein Import. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 559–569.
19. Hieda, M.; Tachibana, T.; Yokoya, F.; Kose, S.; Imamoto, N.; Yoneda, Y. A Monoclonal Antibody to the COOH-Terminal Acidic Portion of Ran Inhibits Both the Recycling of Ran and Nuclear Protein Import in Living Cells. *J. Cell Biol.* **1999**, *144*, 645–655.
20. Clouse, K.N.; Luo, M.-J.; Zhou, Z.; Reed, R. A Ran-Independent Pathway for Export of Spliced mRNA. *Nat. Cell. Biol.* **2001**, *3*, 97–99.
21. Moroianu, J.; Blobel, G. Protein Export from the Nucleus Requires the GTPase Ran and GTP Hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4318–4322.
22. Bischoff, F.R.; Görlich, D. RanBP1 Is Crucial for the Release of RanGTP from Importin β -Related Nuclear Transport Factors. *FEBS Lett.* **1997**, *419*, 249–254.
23. Richards, S.A.; Lounsbury, K.M.; Carey, K.L.; Macara, I.G. A Nuclear Export Signal Is Essential for the Cytosolic Localization of the Ran Binding Protein, RanBP1. *J. Cell Biol.* **1996**, *134*, 1157–1168.
24. Melchior, F.; Gerace, L. Mechanisms of Nuclear Protein Import. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, *7*, 310–318.
25. Dattilo, V.; D’Antona, L.; Talarico, C.; Capula, M.; Catalogna, G.; Iuliano, R.; Schenone, S.; Roperto, S.; Bianco, C.; Perrotti, N.; et al. SGK1 Affects RAN/RANBP1/RANGAP1 via SP1 to Play a Critical Role in Pre-MiRNA Nuclear Export: A New Route of Epigenomic Regulation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45361.

26. di Matteo, G.; Fuschi, P.; Zerfass, K.; Moretti, S.; Ricordy, R.; Cenciarelli, C.; Tripodi, M.; Jansen-Durr, P.; Lavia, P.; Sapienza, L.; et al. Transcriptional Control of the Htf9-A/RanBP-1 Gene during the Cell Cycle. *Cell Growth Differ.* **1995**, *6*, 1213–1224.
27. Guarguaglini, G.; Battistoni, A.; Pittoggi, C.; di Matteo, G.; di Fiore, B.; Lavia, P. Expression of the Murine RanBP1 and Htf9 Genes Is Regulated from a Shared Bidirectional Promoter during Cell Cycle Progression. *Biochem. J.* **1997**, *325*, 277–286.
28. di Fiore, B.; Guarguaglini, G.; Palena, A.; Kerkhoven, R.M.; Bernards, R.; Lavia, P. Two E2F Sites Control Growth-Regulated and Cell Cycle-Regulated Transcription of the Htf9-a/RanBP1 Gene through Functionally Distinct Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10339–10348.
29. Yau, K.C.; Arnaoutov, A.; Aksenova, V.; Kaufhold, R.; Chen, S.; Dasso, M. RanBP1 Controls the Ran Pathway in Mammalian Cells through Regulation of Mitotic RCC1 Dynamics. *Cell Cycle* **2020**, *19*, 1899–1916.
30. Zhang, M.S.; Arnaoutov, A.; Dasso, M. RanBP1 Governs Spindle Assembly by Defining Mitotic Ran-GTP Production. *Dev. Cell* **2014**, *31*, 393–404.
31. Kalab, P.; Pu, R.T.; Dasso, M. The Ran GTPase Regulates Mitotic Spindle Assembly. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 481–484.
32. Takeda, E.; Hieda, M.; Katahira, J.; Yoneda, Y. Phosphorylation of RanGAP1 Stabilizes Its Interaction with Ran and RanBP1. *Cell Struct. Funct.* **2005**, *30*, 69–80.
33. Battistoni, A.; Guarguaglini, G.; Degrassi, F.; Pittoggi, C.; Palena, A.; di Matteo, G.; Pisano, C.; Cundari, E.; Lavia, P. Deregulated Expression of the RanBP1 Gene Alters Cell Cycle Progression in Murine Fibroblasts. *J. Cell Sci.* **1997**, *110*, 2345–2357.
34. Guarguaglini, G.; Renzi, L.; D'Ottavio, F.; Di Fiore, B.; Casenghi, M.; Cundari, E.; Lavia, P. Regulated Ran-Binding Protein 1 Activity Is Required for Organization and Function of the Mitotic Spindle in Mammalian Cells In Vivo. *Cell Growth Differ.* **2000**, *11*, 455–465.

35. Arnautov, A.; Dasso, M. The Ran GTPase Regulates Kinetochore Function. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 99–111.
36. Tedeschi, A.; Ciciarello, M.; Mangiacasale, R.; Roscioli, E.; Rensen, W.M.; Lavia, P. RANBP1 Localizes a Subset of Mitotic Regulatory Factors on Spindle Microtubules and Regulates Chromosome Segregation in Human Cells. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3748–3761.
37. Ciciarello, M.; Roscioli, E.; di Fiore, B.; di Francesco, L.; Sobrero, F.; Bernard, D.; Mangiacasale, R.; Harel, A.; Schininà, M.E.; Lavia, P. Nuclear Reformation after Mitosis Requires Downregulation of the Ran GTPase Effector RanBP1 in Mammalian Cells. *Chromosoma* **2010**, *119*, 651–668.
38. Hwang, H.I.; Ji, J.H.; Jang, Y.J. Phosphorylation of Ran-Binding Protein-1 by Polo-like Kinase-1 Is Required for Interaction with Ran and Early Mitotic Progression. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 33012–33020.
39. Pujol, G.; Söderqvist, H.; Radu, A. Age-Associated Reduction of Nuclear Protein Import in Human Fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 354–358.
40. di Fiore, B.; Ciciarello, M.; Mangiacasale, R.; Palena, A.; Tassin, A.-M.; Cundari, E.; Lavia, P. Mammalian RanBP1 Regulates Centrosome Cohesion during Mitosis. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3399–3411.
41. Wang, W.; Budhu, A.; Forgues, M.; Wang, X.W. Temporal and Spatial Control of Nucleophosmin by the Ran-Crm1 Complex in Centrosome Duplication. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 823–830.
42. Culjkovic-Kraljacic, B.; Baguet, A.; Volpon, L.; Amri, A.; Borden, K.L.B. The Oncogene EIF4E Reprograms the Nuclear Pore Complex to Promote MRNA Export and Oncogenic Transformation. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 207–215.

43. Etchin, J.; Sun, Q.; Kentsis, A.; Farmer, A.; Zhang, Z.C.; Sanda, T.; Mansour, M.R.; Barcelo, C.; McCauley, D.; Kauffman, M.; et al. Antileukemic Activity of Nuclear Export Inhibitors That Spare Normal Hematopoietic Cells. *Leukemia* **2013**, *27*, 66–74.
44. Wei, Z.; Duan, X.; Li, Q.; Li, Q.; Wang, Y. High Expression of Ran Binding Protein 1 Predicts Poor Outcomes in Hepatocellular Carcinoma Patients: A Cancer Genome Atlas Database Analysis. *J. Gastrointest. Oncol.* **2021**, *12*, 2966–2984.
45. Pathria, G.; Wagner, C.; Wagner, S.N. Inhibition of CRM1-Mediated Nucleocytoplasmic Transport: Triggering Human Melanoma Cell Apoptosis by Perturbing Multiple Cellular Pathways. *J. Investig. Dermatol.* **2012**, *132*, 2780–2790.
46. Cáceres-Gorriti, K.Y.; Carmona, E.; Barrès, V.; Rahimi, K.; Létourneau, I.J.; Tonin, P.N.; Provencher, D.; Mes-Masson, A.M. RAN Nucleo-Cytoplasmic Transport and Mitotic Spindle Assembly Partners XPO7 and TPX2 Are New Prognostic Biomarkers in Serous Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91000.
47. Talarico, C.; Dattilo, V.; D'Antona, L.; Menniti, M.; Bianco, C.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; Schenone, S.; Perrotti, N.; Amato, R. SGK1, the New Player in the Game of Resistance: Chemo-Radio Molecular Target and Strategy for Inhibition. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *39*, 1863–1876.
48. Amato, R.; Menniti, M.; Agosti, V.; Boito, R.; Costa, N.; Bond, H.M.; Barbieri, V.; Tagliaferri, P.; Venuta, S.; Perrotti, N. IL-2 Signals through Sgk1 and Inhibits Proliferation and Apoptosis in Kidney Cancer Cells. *J. Mol. Med.* **2007**, *85*, 707–721.
49. Amato, R.; D'Antona, L.; Porciatti, G.; Agosti, V.; Menniti, M.; Rinaldo, C.; Costa, N.; Bellacchio, E.; Mattarocci, S.; Fuiano, G.; et al. Sgk1 Activates MDM2-Dependent P53 Degradation and Affects Cell Proliferation, Survival, and Differentiation. *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 1221–1239.

50. Amato, R.; Scumaci, D.; D'Antona, L.; Iuliano, R.; Menniti, M.; di Sanzo, M.; Faniello, M.C.; Colao, E.; Malatesta, P.; Zingone, A.; et al. Sgk1 Enhances RANBP1 Transcript Levels and Decreases Taxol Sensitivity in RKO Colon Carcinoma Cells. *Oncogene* **2013**, *32*, 4572–4578.
51. Talarico, C.; D'Antona, L.; Scumaci, D.; Barone, A.; Gigliotti, F.; Fiumara, C.V.; Dattilo, V.; Gallo, E.; Visca, P.; Ortuso, F.; et al. Preclinical Model in HCC: The SGK1 Kinase Inhibitor SI113 Blocks Tumor Progression in Vitro and in Vivo and Synergizes with Radiotherapy. *Oncotarget* **2015**, *6*, 37511.
52. D'Antona, L.; Amato, R.; Talarico, C.; Ortuso, F.; Menniti, M.; Dattilo, V.; Iuliano, R.; Gigliotti, F.; Artese, A.; Costa, G.; et al. SI113, a Specific Inhibitor of the Sgk1 Kinase Activity That Counteracts Cancer Cell Proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2015**, *35*, 2006–2018.
53. Talarico, C.; Dattilo, V.; D'Antona, L.; Barone, A.; Amodio, N.; Belviso, S.; Musumeci, F.; Abbruzzese, C.; Bianco, C.; Trapasso, F.; et al. SI113, a SGK1 Inhibitor, Potentiates the Effects of Radiotherapy, Modulates the Response to Oxidative Stress and Induces Cytotoxic Autophagy in Human Glioblastoma Multiforme Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 15868.
54. Abbruzzese, C.; Matteoni, S.; Persico, M.; Ascione, B.; Schenone, S.; Musumeci, F.; Amato, R.; Perrotti, N.; Matarrese, P.; Paggi, M.G. The Small Molecule SI113 Hinders Epithelial-to-mesenchymal Transition and Subverts Cytoskeletal Organization in Human Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 22529–22542.
55. Conza, D.; Mirra, P.; Cali, G.; Tortora, T.; Insabato, L.; Fiory, F.; Schenone, S.; Amato, R.; Beguinot, F.; Perrotti, N.; et al. The SGK1 Inhibitor SI113 Induces Autophagy, Apoptosis, and Endoplasmic Reticulum Stress in Endometrial Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *232*, 3735–3743.

56. Catalogna, G.; Talarico, C.; Dattilo, V.; Gangemi, V.; Calabria, F.; D'Antona, L.; Schenone, S.; Musumeci, F.; Bianco, C.; Perrotti, N.; et al. The SGK1 Kinase Inhibitor SI113 Sensitizes Theranostic Effects of the $^{64}\text{CuCl}_2$ in Human Glioblastoma Multiforme Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *43*, 108–119.
57. D'Antona, L.; Dattilo, V.; Catalogna, G.; Scumaci, D.; Fiumara, C.V.; Musumeci, F.; Perrotti, G.; Schenone, S.; Tallerico, R.; Spoleti, C.B.; et al. In Preclinical Model of Ovarian Cancer, the SGK1 Inhibitor SI113 Counteracts the Development of Paclitaxel Resistance and Restores Drug Sensitivity. *Transl. Oncol.* **2019**, *12*, 1045–1055.
58. Abbruzzese, C.; Catalogna, G.; Gallo, E.; di Martino, S.; Mileo, A.M.; Carosi, M.; Dattilo, V.; Schenone, S.; Musumeci, F.; Lavia, P.; et al. The Small Molecule SI113 Synergizes with Mitotic Spindle Poisons in Arresting the Growth of Human Glioblastoma Multiforme. *Oncotarget* **2017**, *8*, 110743–110755.
59. Zheng, D.; Cao, M.; Zuo, S.; Xia, X.; Zhi, C.; Lin, Y.; Deng, S.; Yuan, X. Correction: RANBP1 Promotes Colorectal Cancer Progression by Regulating Pre-MiRNA Nuclear Export via a Positive Feedback Loop with YAP. *Oncogene* **2022**, *41*, 930–942.
60. Grbc'ić, P.; Fuc'kar Cupić, D.; Gamberi, T.; Kraljević Pavelić, S.; Sedić, M. Proteomic Profiling of BRAFV600E Mutant Colon Cancer Cells Reveals the Involvement of Nucleophosmin/c-Myc Axis in Modulating the Response and Resistance to BRAF Inhibition by Vemurafenib. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6174.
61. Hilliard, M.; Frohnert, C.; Spillner, C.; Marcone, S.; Nath, A.; Lampe, T.; Fitzgerald, D.J.; Kehlenbach, R.H. The Anti-Inflammatory Prostaglandin 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 Inhibits CRM1-Dependent Nuclear Protein Export. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22202–22210.
62. Liu, X.; Chong, Y.; Liu, H.; Han, Y.; Niu, M. Novel Reversible Selective Inhibitor of CRM1 for Targeted Therapy in Ovarian Cancer. *J. Ovarian Res.* **2015**, *8*, 1–9.

63. Rensen, W.M.; Roscioli, E.; Tedeschi, A.; Mangiacasale, R.; Ciciarello, M.; di Gioia, S.A.; Lavia, P. RanBP1 Downregulation Sensitizes Cancer Cells to Taxol in a Caspase-3-Dependent Manner. *Oncogene* **2009**, *28*, 1748–1758.
64. Nan, G.; Zhao, S.H.; Wang, T.; Chao, D.; Tian, R.F.; Wang, W.J.; Fu, X.; Lin, P.; Guo, T.; Wang, B.; et al. CD147 Supports Paclitaxel Resistance via Interacting with RanBP1. *Oncogene* **2022**, *41*, 983–996.
65. Vaidyanathan, S.; Thangavelu, P.U.; Duijf, P.H.G. Overexpression of Ran GTPase Components Regulating Nuclear Export, but Not Mitotic Spindle Assembly, Marks Chromosome Instability and Poor Prognosis in Breast Cancer. *Target. Oncol.* **2016**, *11*, 677–686.
66. Mencarelli, C.; Nitarska, J.; Kroeber, T.; Ferraro, F.; Massey, K.; Riccio, A.; Pichaud, F. RanBP1 Couples Nuclear Export and Golgi Regulation through LKB1 to Promote Cortical Neuron Polarity. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 2529–2539.e4.
67. Barriga, E.H.; Alasaadi, D.N.; Mencarelli, C.; Mayor, R.; Pichaud, F. RanBP1 Plays an Essential Role in Directed Migration of Neural Crest Cells during Development. *Dev. Biol.* **2022**, *492*, 79–86.
68. Orphanet. 22q11.2 Deletion Syndrome. Available online: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=it&Expert=567 (accessed on 17 October 2022).
69. Butcher, N.J.; Marras, C.; Pondal, M.; Rusjan, P.; Boot, E.; Christopher, L.; Repetto, G.M.; Fritsch, R.; Chow, E.W.C.; Masellis, M.; et al. Neuroimaging and Clinical Features in Adults with a 22q11.2 Deletion at Risk of Parkinson’s Disease. *Brain* **2017**, *140*, 1371–1383.
70. Cheong, H.S.; Park, B.L.; Kim, E.M.; Park, C.S.; Sohn, J.W.; Kim, B.J.; Kim, J.W.; Kim, K.H.; Shin, T.M.; Choi, I.G.; et al. Association of RANBP1 Haplotype with Smooth Pursuit

- Eye Movement Abnormality. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2011**, *156*, 67–71.
71. Paronett, E.M.; Meechan, D.W.; Karpinski, B.A.; LaMantia, A.S.; Maynard, T.M. Ranbp1, Deleted in DiGeorge/22q11.2 Deletion Syndrome, Is a Microcephaly Gene That Selectively Disrupts Layer 2/3 Cortical Projection Neuron Generation. *Cereb. Cortex* **2015**, *25*, 3977–3993.
72. Wenger, T.L.; Kao, C.; McDonald-McGinn, D.M.; Zackai, E.H.; Bailey, A.; Schultz, R.T.; Morrow, B.E.; Emanuel, B.S.; Hakonarson, H. The Role of MGluR Copy Number Variation in Genetic and Environmental Forms of Syndromic Autism Spectrum Disorder. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–6.
73. Zolotukhin, A.S.; Felber, B.K. Mutations in the Nuclear Export Signal of Human Ran-Binding Protein RanBP1 Block the Rev-Mediated Posttranscriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11356–11360.
74. Woods, M.W.; Tong, J.G.; Tom, S.K.; Szabo, P.A.; Cavanagh, C.; Dikeakos, J.D.; Barr, S.D. Interferon-Induced HERC5 Is Evolving under Positive Selection and Inhibits HIV-1 Particle Production by a Novel Mechanism Targeting Rev/RRE-Dependent RNA Nuclear Export. *Retrovirology* **2014**, *11*, 27.
75. Rothmeier, E.; Pfaffinger, G.; Hoffmann, C.; Harrison, C.F.; Grabmayr, H.; Repnik, U.; Hannemann, M.; Wolke, S.; Bausch, A.; Griffiths, G.; et al. Activation of Ran GTPase by a Legionella Effector Promotes Microtubule Polymerization, Pathogen Vacuole Motility and Infection. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003598.
76. Hilbi, H.; Rothmeier, E.; Hoffmann, C.; Harrison, C.F. Beyond Rab GTPases Legionella Activates the Small GTPase Ran to Promote Microtubule Polymerization, Pathogen Vacuole Motility, and Infection. *Small GTPases* **2014**, *5*, e972859.

77. Mangos, S.; Vanderbeld, B.; Krawetz, R.; Sudol, K.; Kelly, G.M. Ran Binding Protein RanBP1 in Zebrafish Embryonic Development. *Mol. Reprod. Dev.* **2001**, *59*, 235–248.
78. Nagai, M.; Moriyama, T.; Mehmood, R.; Tokuhiko, K.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Tanaka, H.; Yoneda, Y. Mice Lacking Ran Binding Protein 1 Are Viable and Show Male Infertility. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 791–796.
79. Davalieva, K.; Rusevski, A.; Velkov, M.; Noveski, P.; Kubelka-Sabit, K.; Filipovski, V.; Plaseski, T.; Dimovski, A.; Plaseska- Karanfilska, D. Comparative Proteomics Analysis of Human FFPE Testicular Tissues Reveals New Candidate Biomarkers for Distinction among Azoospermia Types and Subtypes. *J. Proteom.* **2022**, *267*, 104686.
80. Seewald, M.; Körner, C.; Wittinghofer, A.; Vetter, I.R. RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* **2002**, *415*, 662–666.
81. Radi M, Tintori C, Musumeci F; et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines active in vivo on the Bcr-Abl on T315I mutant. *J Med Chem* **2013**, *56*, 5382-5394.
82. Tintori C, Schenone S, Musumeci F; et al. Combining X-ray crystallography and molecular modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-Src inhibitors active in vivo against neuroblastoma. *J Med Chem* **2015** *58*, 347-361.
83. Di Maria S, Picarazzi F, Mori M, Ciancusi A, Carbone A, Crespan E, Perini C, Sabetta S, Deplano S, Poggialini F, Molinari A, Aronne R, Maccioni E, Maga G, Angelucci A, Schenone S, Musumeci F, Dreassi E. Novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as dual Src/Bcr-Abl kinase inhibitors: Synthesis and biological evaluation for chronic myeloid leukemia treatment. *Bioorg Chem.* **2022**, *128*, 106071.
84. Vignaroli G, Iovenitti G, Zamperini C, Coniglio F, Calandro P, Molinari A, Fallacara AL, Sartucci A, Calgani A, Colecchia D, Mancini A, Festuccia C, Dreassi E, Valoti M, Musumeci F, Chiariello M, Angelucci A, Botta M, Schenone S. Prodrugs of Pyrazolo[3,4-

d]pyrimidines: From Library Synthesis to Evaluation as Potential Anticancer Agents in an Orthotopic Glioblastoma Model. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6305-6320.

*Dedico la mia tesi alle mie care nonne,
Elena e Lisetta,
che oggi non ci sono più,
ma che ringrazio per i loro insegnamenti
e che ricordo con tanto amore.*

Con piacere dedico questo spazio della mia tesi alle persone che mi hanno sostenuto in questo meraviglioso percorso.

Innanzitutto desidero ringraziare la mia relatrice, la Professoressa Schenone, e la mia correlatrice, la Professoressa Musumeci, che mi hanno dato la possibilità di frequentare il laboratorio di sintesi sperimentale presso il quale ho condotto questo progetto di tesi.

Ringrazio con il cuore i miei genitori, Anna e Franco, e mio fratello, Roberto, perché è grazie ai vostri sacrifici che sono qui oggi. Grazie per avermi permesso di seguire la mia strada e dato la forza ogni singolo giorno.

Ringrazio il mio fidanzato, Andrea, per avermi sempre ascoltato, consigliato e supportato. Grazie per aver creduto in me, anche quando non ci credevo io stessa, e avermi strappato un sorriso anche nei momenti più complicati.

Ringrazio mia sorella, Elga, per avermi sempre appoggiata e per avermi trasmesso, grazie alla sua esperienza, le bellezze di questa facoltà, che ha permesso di coniugare le mie potenzialità con la mia passione.

Ringrazio Valentina per aver condiviso con me, tra ansie e gioie, parte di questa esperienza, ed essere stata sempre al mio fianco.

Ringrazio Elena e Mauro per la vicinanza e le belle parole che mi avete sempre dedicato.

Ringrazio le mie amiche per essermi state costantemente accanto, nei momenti belli e in quelli meno belli.

Infine un ringraziamento a me stessa, che questo possa essere un lieto fine e, contemporaneamente, un meraviglioso nuovo inizio.