

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 un piccolo set di derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici  
6-tiometil sostituiti attivi come inibitori delle tirosina chinasi  
citoplasmatiche Src, Abl e Fyn**

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Schenone

Candidata:

Chiara Pastorini

Anno Accademico 2019-2020

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>3</b>
1.1 <b>LE PROTEINE-CHINASI: STRUTTURA E FUNZIONE</b>	<b>3</b>
1.2 <b>FAMIGLIA DI CHINASI SRC (SFKS)</b>	<b>4</b>
1.2.1 SRC e tumori	6
1.3 <b>FYN</b>	<b>7</b>
1.3.1 FYN: struttura e regolazione	8
1.3.2 FYN e patologie del SNC	9
1.3.3 FYN e tumori	.10
1.4 <b>BCR-ABL E LMC</b>	<b>14</b>
1.5 <b>INIBITORI DI SFKS E BCR-ABL</b>	<b>16</b>
1.5.1. Imatinib	17
1.5.2. Dasatinib	18
1.5.3. Bosutinib	20
1.5.4. Saracatinib	22
1.5.5. Ponatinib	25
1.5.6. Vandetanib	26
1.5.7. PP1 e PP2	30
<b>2. PROGETTO</b>	<b>31</b>
<b>3. DISCUSSIONE</b>	<b>35</b>
3.1 Chimica	35
3.2 Biologia	37
<b>4. CONCLUSIONI</b>	<b>39</b>
<b>5. PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>41</b>
5.1 Chimica	41
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>54</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Le Proteine Chinasi: Struttura e Funzione

Le proteine chinasi sono enzimi che catalizzano la fosforilazione di proteine mediante il trasferimento di un gruppo fosfato su amminoacidi specifici presenti sulla proteina bersaglio.

I geni delle proteine chinasi costituiscono una tra le più vaste famiglie di geni dell'uomo (circa 1.7% del genoma) [1]. Ad oggi ne sono stati identificati 518, 478 tipici e 40 atipici [2].

Dal momento che tali enzimi svolgono un ruolo fondamentale nel regolare la maggior parte delle vie metaboliche della cellula, la deregolazione e le anomalie nell'attività delle proteine chinasi possono portare a varie patologie inclusi cancro, malattie infiammatorie, diabete, neurodegenerazione e malattie del sistema nervoso centrale (SNC). Le proteine chinasi sono coinvolte nella motilità cellulare, nella progressione del ciclo cellulare e nell'apoptosi sono quindi un importante bersaglio per lo sviluppo di nuove molecole inibitorie per il trattamento mirato di varie condizioni patologiche.

Nelle cellule animali sono presenti due tipi di proteine chinasi a seconda dell'amminoacido che viene fosforilato: tirosina chinasi (TK, tyrosine kinases) e serina/treonina chinasi [2].

Le TK sono il gruppo più studiato e sono suddivise in due sottoclassi:

- Le tirosina chinasi recettoriali (RTKs, receptor tyrosine kinases) transmembrana, come il recettore per l'insulina, e i recettori per il fattore di crescita epidermico (EGF, epidermal growth factor), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF, platelet-derived growth factor) e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF, fibroblast growth factor). Queste sono costituite da una porzione extracellulare che lega i ligandi, un'elica transmembrana e una porzione citoplasmatica con attività catalitica chinasica che rende possibile la trasmissione di segnali dall'esterno della cellula fino al nucleo.

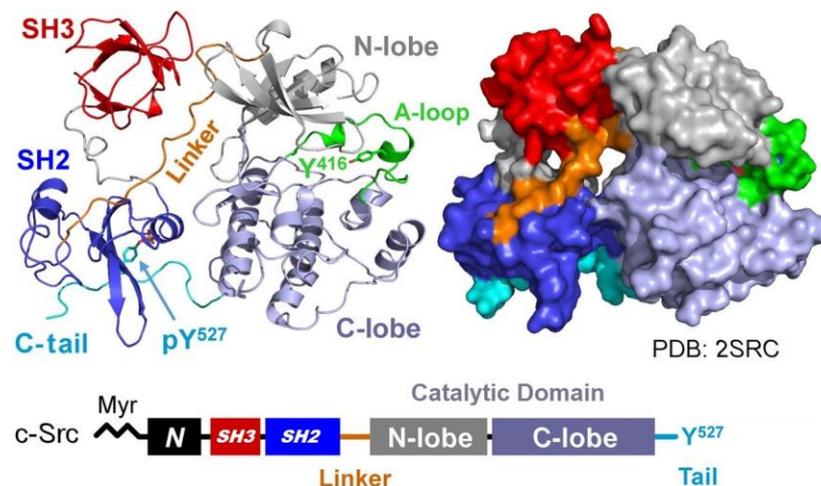
- Le tirosina chinasi non recettoriali (nRTKs, non-receptor tyrosine kinases) sono localizzate nel citoplasma e hanno anch'esse la funzione di trasdurre il segnale al nucleo. Alcune di queste possiedono gruppi nella porzione ammino terminale che permettono loro di ancorarsi al lato interno della membrana cellulare [3]. In aggiunta al sito catalitico chinamico, le nRTKs possiedono domini che mediano le interazioni proteina-proteina, proteina-lipidi e proteina-DNA. Esempi di nRTKs sono Abl, Csk, Fak, Jak, Hck, Ack, e la famiglia delle chinasi Src [4].

## **1.2 Famiglia di Chinasi Src (Src Family Kinases, SFKs)**

Src è una TK citoplasmatica coinvolta nelle vie di trasduzione del segnale e assume un ruolo essenziale nella regolazione di molti processi cellulari come l'apoptosi, la progressione del ciclo cellulare, la differenziazione, la proliferazione, la motilità, l'adesione cellulare. Src è ubiquitaria, ma il cervello, gli osteoclasti e le piastrine esprimono livelli di Src da 5 a 200 volte più elevati rispetto ad altre cellule [1]. La deregolazione di Src avviene in molte patologie, tra cui il cancro e le malattie infiammatorie e per questo motivo è stata oggetto di studi per anni.

Src è un membro delle SFKs. Tale famiglia comprende 11 membri: Src, Fyn, Yes, Fgr (gruppo I), Blk, Hck, Lck, Lyn (gruppo II), Frk, Srm, Brk (gruppo III). La loro struttura è costituita da differenti domini funzionali. Src contiene il dominio N-terminale miristorilato, cioè legato ad un residuo di acido miristico. Questa porzione è collegata al dominio SH4 (Src homology 4), che è responsabile dell'associazione tra Src e la membrana cellulare. Si trovano poi i domini SH2 (Src homology 2) e SH3 (Src homology 3) che mediano le interazioni tra Src e il substrato o quelle intramolecolari, il dominio catalitico TK (SH1, Src homology 1) e un dominio C-terminale con attività regolatoria negativa. SH1 è composto da due lobi (N-terminale e C-terminale) separati da una tasca catalitica dove si lega l'ATP e dove troviamo

siti leganti il substrato per il trasferimento del fosfato. La tasca forma un loop di attivazione che contiene la tirosina 416 (Tyr416) che è il sito di regolazione positivo responsabile dell'attività della chinasi (**Fig.1**).



**Fig.1.** Struttura di Src

Src, infatti, esiste in due forme: una conformazione chiusa, inattiva ed una aperta e attiva. I due residui fondamentali nella regolazione della conformazione di Src sono gli amminoacidi Tyr-416 e Tyr-527 che sono fosforilati e defosforilati rispettivamente nello stato attivo e in quello inattivo. In condizioni basali *in vivo*, il 90-95% di Src è presente nella forma inattiva [5]. L'attivazione di Src è promossa dalla defosforilazione di Tyr527 da parte di varie fosfatasi [6]. In questo modo la struttura di Src può assumere una conformazione in cui avviene l'autofosforilazione del residuo Tyr416 e l'accesso del substrato al dominio chinasi.

Src può anche essere attivato dal cambio di conformazione dei domini SH3 e SH2 mediato da interazioni intermolecolari con recettori dei fattori di crescita, ad esempio il recettore per EGF (EGFR), il recettore per PDGF (PDGFR), il recettore per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor), il recettore per FGF (FGFR) [7] i recettori per l'adesione delle integrine [8], i recettori per gli ormoni steroidei, i recettori accoppiati alle proteine G e le chinasi di adesione focale (Fak, focal adhesion kinase) [9].

### 1.2.1 Src e tumori

La crescita tumorale è tipicamente associata ad aumentata proliferazione, ridotta apoptosi, inibizione di autofagia, e aumentata angiogenesi. Inoltre, l'invasione di tumori primari e la formazione di metastasi comporta l'alterazione dei processi di adesione, maggiore motilità e grado elevato di intravasazione/extravasazione cellulare.

Nelle cellule sane Src si presenta in uno stato prevalentemente inattivo e viene transitoriamente attivato solo quando coinvolto in eventi cellulari. La sovraespressione e/o l'iperattivazione di Src sono associate ad una potenziale neoplasia, avendo un ruolo nella progressione, nel mantenimento e nella sopravvivenza di molti tipi di tumore: tumori solidi del colon [10], mammella [11], polmoni [12], fegato [13], prostata [14] e tumori pancreatici [15], tumori del SNC come il glioblastoma multiforme (GBM) [16,5], neuroblastoma [17] e tumori ematologici come la leucemia mieloide cronica (LMC, chronic myeloid leukemia) [18] e i linfomi [19].

Src ha quindi un ruolo fondamentale nel promuovere la proliferazione tumorale attraverso segnali derivanti da recettori dei fattori di crescita, attraverso l'induzione di espressione delle cicline e attraverso la mediazione delle vie di JAK/STAT [20]. Inoltre è dimostrato che Src attiva vie di trasduzione di segnali antiapoptotici, tra cui quelli mediati dalla segnalazione di PI3K e Akt [21].

Src può indurre alterazioni nell'adesione cellula-cellula e aumentare il turnover dei contatti tra cellula e matrice extracellulare (ECM, extracellular matrix), pertanto è coinvolto nella migrazione, invasione e metastatizzazione della cellula tumorale. La ridotta adesività cellulare mediata da Src deriva da vari meccanismi tra cui la redistribuzione di componenti proteici di adesione focale [22], l'alterata regolazione del segnale delle integrine e una ridotta deposizione delle proteine di ECM [23].

L'attività di Src può influire sulla extravasazione attraverso il suo ruolo sulle vie di segnale di VEGF, dei recettori delle chemochine (CXCR1 e CXCR2, chemokine receptors) [24] e dei recettori dell'urochinasi [25]. Src può indurre l'espressione di VEGF e ha quindi un importante ruolo nei processi angiogenetici: è stato dimostrato che nei tumori solidi l'inibizione di Src riduce l'espressione di VEGF, riducendo l'attività pro-angiogenetica [26].

### **1.3 Fyn**

Fyn è un'altra TK citoplasmatica che appartiene, come Src, alla famiglia delle SFKs [27]. Fyn è localizzata principalmente nella porzione citoplasmatica della membrana cellulare, dove fosforila i residui tirosinici di enzimi coinvolti in differenti vie di segnale.

Sono state identificate diverse funzioni biologiche in cui è coinvolta l'attività di Fyn, ad esempio la segnalazione mediata da fattori di crescita e citochine, l'attivazione piastrinica, la via di segnalazione dei recettori dei linfociti T e dei linfociti B, la guida degli assoni, la fecondazione, l'ingresso in mitosi, la differenziazione di cellule natural-killer, oligodendrociti e cheratinociti [28].

Fyn è inoltre coinvolta nelle vie di trasduzione del segnale nel SNC e nel sistema immunitario periferico [29,30], dove riveste un importante ruolo nella regolazione e nelle funzioni di sviluppo e attivazione dei linfociti T [31].

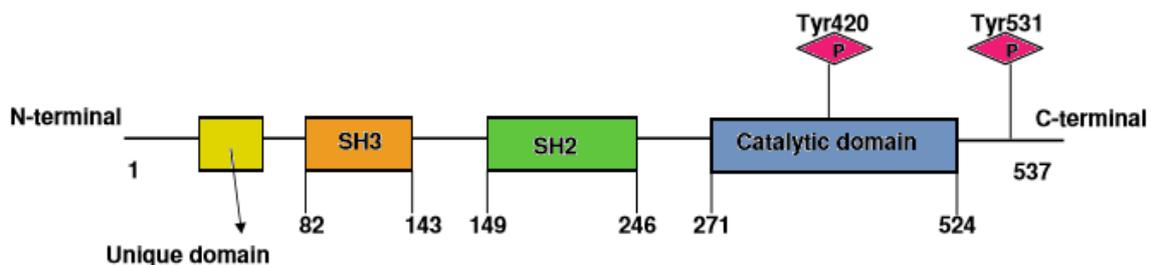
La sovraespressione di Fyn induce trasformazione morfogenica, alterazione dei segnali mitotici, stimolazione di crescita e proliferazione cellulare. Fyn inoltre partecipa all'attività delle integrine e nelle interazioni cellula-cellula. Per tutte queste ragioni possiamo affermare che Fyn è coinvolta nella genesi del cancro [32,33]

#### **1.3.1 Fyn: Struttura e Regolazione**

Fyn è una proteina di 59 kDa comprendente 537 amminoacidi, codificata dal gene Fyn, localizzato sul cromosoma 6q21. Esistono 3 isoforme di Fyn: l'isoforma 1 (Fyn [B],

"sequenza canonica"), la prima identificata, l'isoforma 2 (Fyn [T]), espressa nei linfociti T [34] e l'isoforma 3, riscontrata in cellule del sangue. Anche se molti tessuti esprimono entrambe le prime due isoforme, Fyn [B] è altamente espressa nel cervello e Fyn [T] è altamente espressa nei linfociti T.

Fyn, come gli altri membri delle SFKs, [35] è formata da diverse porzioni funzionali connesse tra loro in una singola catena proteica: troviamo il dominio unico, i domini SH3 e SH2 e il dominio SH1 (o catalitico). SH2 e SH3 interagiscono con altre proteine e queste interazioni regolano l'attività tirosin-chinasica. Il dominio chinasico, che catalizza il trasferimento del gruppo fosfato terminale dell'ATP al residuo di tirosina di un substrato proteico, presenta una tipica struttura bilobata formata da un piccolo lobo N-terminale, coinvolto nel legame con ATP, e un più grande lobo C-terminale, dove è presente un segmento di attivazione (A-loop) con un residuo tirosinico conservato (Tyr420) che è autofosforilato nella forma attiva dell'enzima [36]. Il dominio unico è composto da 60 amminoacidi e localizzato nella porzione N-terminale della proteina; il suo ruolo non è completamente chiarito, ma è altamente probabile che sia necessario per la localizzazione intracellulare dell'enzima [37] (**Fig.2**).



**Fig.2** Struttura di Fyn.

L'attivazione di Fyn, come per altri membri delle SFKs, dipende dal legame dei ligandi al dominio SH2 e/o SH3 e dalla fosforilazione/defosforilazione dei due residui tirosinici chiave, Tyr420 e Tyr531. In particolare, la fosforilazione di Tyr531 promuove la conformazione chiusa dell'enzima, in cui il sito catalitico non è accessibile all'ATP ed ai substrati proteici.

Invece, la fosforilazione di Tyr420 provoca l'attivazione di Fyn e comporta una conformazione aperta ed attiva del sito catalitico [33,38].

### **1.3.2 Fyn e patologie del SNC**

Fyn è profondamente implicato sia nello sviluppo cerebrale che nella fisiologia del cervello adulto. Le funzioni biologiche di Fyn nel cervello sono state ampiamente studiate mediante modelli di animali transgenici. Questi studi hanno dimostrato che Fyn è un elemento fondamentale nello sviluppo e nelle funzioni del SNC. I topi deficitari di Fyn hanno mostrato diversi difetti neuronali, tra cui un'alterata struttura dell'ippocampo, un anormale potenziamento a lungo termine [39] e un'aumentata sensibilità all'etanolo [40], suggerendo l'importanza fisiologica di Fyn in differenti vie di segnali neuronali.

Inoltre Fyn riveste un ruolo determinante nella mielinizzazione del SNC in molte aree cerebrali, tra cui le cellule gliali della sostanza bianca e in oligodendrociti di coltura [41]. Fyn è anche coinvolto nella differenziazione morfologica che porta alla formazione dell'assone negli oligodendrociti. È stato dimostrato che le interazioni di Fyn con la proteina Tau negli oligodendrociti hanno un ruolo nello sviluppo della mielinizzazione e che la mancanza di un'interazione funzionale tra Tau e Fyn potrebbe essere alla base di alcune malattie neurodegenerative del SNC, tra cui la sclerosi multipla, dove la degenerazione assonale è un fattore chiave nel declino clinico [42].

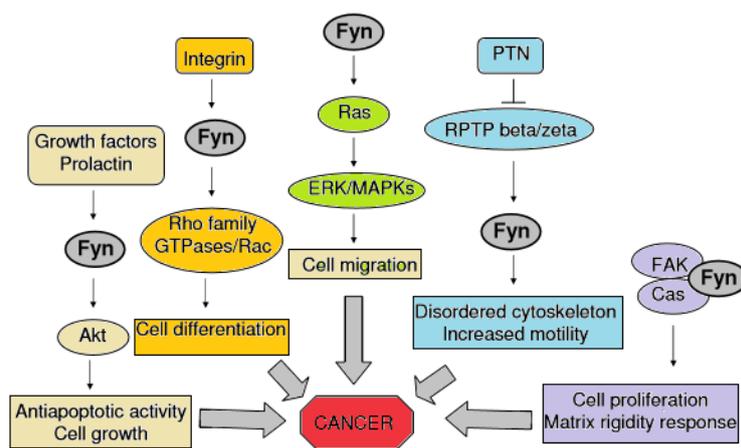
L'iperattivazione/deregolazione di Fyn è anche coinvolta in patologie neurodegenerative come l'Alzheimer (AD, Alzheimer's disease) e altre taupatie, caratterizzate dall'alterazione della proteina Tau. Lee *et al.* hanno dimostrato che Fyn fosforila Tau sulla Tyr18 e che la forma fosforilata di Tau è presente nei grovigli neurofibrillari del cervello di pazienti con AD, fornendo ulteriori evidenze del coinvolgimento di Fyn nelle taupatie [43].

La proteina Tau fosforilata è presente anche nella demenza frontotemporale associata al cromosoma 17 (FTP-17), una patologia neurodegenerativa età-correlata causata dalla mutazione del gene Tau [44,45].

Tau è fosforilata sulla Tyr18 da Fyn in risposta alla proteina beta-amiloide ( $A\beta$ ), responsabile della formazione di placche neuritiche, un altro segno caratteristico di AD [46]. La deplezione di Fyn conferisce protezione nei confronti della neurotossicità indotta da  $A\beta$  [47] e, usando topi transgenici che esprimono sia AAP (amyloid precursor protein, proteina precursore della beta-amiloide) umana, sia Fyn, è stato dimostrato che Fyn induce danni sinaptici e cognitivi in modelli transgenici di topo per AD. Infatti, l'aumentata espressione di Fyn è sufficiente a indurre deficit neuronali pur nel contesto di un moderato livello di  $A\beta$  e, per questo motivo, l'inibizione dell'attività di Fyn potrebbe aiutare a contrastare i danni indotti da  $A\beta$  [48]. Questi e altri dati supportano l'ipotesi che Fyn svolga un ruolo fondamentale nella tossicità sinaptica e nella neurotossicità mediata da  $A\beta$  [33].

### **1.3.3 Fyn e tumori**

Come altri membri delle SFK, Fyn è implicato in diversi processi fisiologici, tra cui non solo la crescita cellulare e la proliferazione, ma anche la morfogenesi e la motilità cellulare, la cui aberrazione può causare lo sviluppo del cancro [49] (**Fig.3**).



**Fig.3** Vie di segnalazione iperattivate nel cancro che coinvolgono Fyn.

Il suo ruolo di potenziale oncogene è stato studiato a partire dal 1988, quando Kawakami *et al.* hanno dimostrato che la sovraespressione di Fyn induce una trasformazione morfologica e una crescita indipendente dall'ancoraggio nelle cellule NIH 3T3. Inoltre, anche se a frequenza relativamente bassa, Fyn ha proprietà di oncogene ad azione dominante in grado di indurre il fenotipo tumorigenico [32].

Fyn è coinvolto in diverse vie di segnalazione iperattivate nel cancro. Insieme ad altri membri di SFK, è un mediatore dell'attività antiapoptotica indotta dal fattore di crescita di Akt/PKB [50,51] e nella regolamentazione di Rac e Rho GTPases e di ERK/MAPK, percorsi enzimatici iperattivati nel cancro [28].

Fyn è anche coinvolto in processi di proliferazione di diverse linee cellulari: nei topi carenti di Fyn, infatti, i linfociti presentano un blocco della citocinesi, processo in cui il citoplasma di una singola cellula eucariotica si divide per formare due cellule figlie [52].

Inoltre Fyn svolge un ruolo importante nella rigidità della matrice che è coinvolta nella motilità cellulare e nella diffusione, nel rimodellamento della matrice e nella crescita ancoraggio-indipendente; tutti questi processi, se alterati, possono portare allo sviluppo del cancro e alla formazione di metastasi. Infatti, la risposta all'aumento della rigidità della matrice porta alla disorganizzazione dei tessuti e alla degenerazione cellulare [53].

Kostic *et al.* hanno dimostrato che Fyn ha un ruolo importante per la mobilità cellulare [54].

Diversi studi riportano il coinvolgimento di Fyn in molte neoplasie, ma il maggior numero di pubblicazioni su Fyn e tumori è legato al coinvolgimento di questa chinasi nel cancro al seno. Alcune linee cellulari di cancro al seno (MDA-MB-231, T47D e SK-Br3) sono state coltivate su cellule staminali mesenchimali derivate dal midollo osseo come monostrato. In questo modo le cellule tumorali possono migrare e formare metastasi. Queste cellule hanno elevati livelli di diversi oncogeni, tra cui Fyn, che possono promuovere le metastasi del cancro al seno attraverso la facilitazione della transizione epiteliale a mesenchimale (EMT, epithelial to mesenchymal transition), un programma di trasformazione cellulare caratterizzato dalla perdita di aderenza cellulare, la repressione dell'espressione della E-caderina e una maggiore mobilità cellulare [55].

Utilizzando anticorpi che riconoscono le SFKs, si è osservato che il 48% dei campioni di tumore al seno analizzati presenta un'elevata espressione/attività di SFKs, tra cui Fyn e Yes, rispetto al tessuto normale [56]. Kostic *et al.* hanno studiato il tropismo tissutale della metastasi del cancro al seno e i processi cellulari alla base di questo fenomeno, dimostrando che la rigidità della matrice tissutale influenzava selettivamente la proliferazione cellulare e l'invasività. Inibendo Fyn, che ha un ruolo determinante nella rigidità della fibronectina nei fibroblasti e nei neuroni [54] si riduce, di conseguenza, la risposta di rigidità della matrice tissutale.

Fyn svolge un ruolo determinante anche in altre neoplasie.

Posadas *et al.* hanno dimostrato che Fyn, e non altre SFKs, è sovraespressa nel cancro alla prostata. Fyn interagisce con Fak e paxillina (PXN), regolatori della morfologia cellulare e della motilità. Confrontando campioni normali con campioni di cancro, è stato rilevato un aumento di 2.1 volte del livello di Fyn, un aumento di 1.7 volte di Fak e un raddoppio di PXN. Questi studi sostengono l'ipotesi che Fyn e i suoi partner di segnalazione siano

sovraespressi nel cancro alla prostata e individuano Fyn come obiettivo terapeutico mirato [57].

Alcuni studi hanno evidenziato l'elevato potenziale metastatico di Fyn nel melanoma murino [58] e nel carcinoma a cellule squamose invasivo orale [59].

Per quanto riguarda i tumori cerebrali, alcuni autori hanno evidenziato che il gene Fyn, insieme ad altri geni coinvolti nello sviluppo cerebrale e nella differenziazione neuronale, sono significativamente rappresentati nell'astrocitoma, neoplasia umana molto comune e letale [60]. Inoltre Fyn e Src sono attivi nella segnalazione alterata di EGFR in pazienti con glioblastoma e promuovono la progressione e la sopravvivenza delle cellule tumorali *in vivo*. Questo dimostra l'importanza delle terapie mirate anti-EGFR e anti-SFK [61]. Chen *et al.* hanno dimostrato che la sovraespressione di Fyn è correlata con la metastatizzazione del cancro al pancreas umano. Infatti, l'inibizione dell'attivazione di Fyn ha diminuito le metastasi epatiche indotte da cellule tumorali pancreatiche xenografate in topi nudi. Ulteriori analisi hanno mostrato che l'attività di Fyn modula la formazione di metastasi delle cellule pancreatiche attraverso la regolazione della proliferazione e dell'apoptosi [62].

Menges *et al.*, applicando uno screening proteomico, hanno identificato nuove molecole di segnalazione, tra cui JAK1, STAT1, cortactina, FER, p130Cas, Src e Fyn, come proteine fosforilate e attivate nel mesotelioma umano maligno. Poiché tutti questi enzimi sembrano essere iperattivati nelle linee cellulari di mesotelioma, è probabile che, per una potenziale attività antiproliferativa, sia più efficace l'inibizione doppia o multipla di alcune di questi fattori piuttosto che l'inibizione di una singola proteina [63].

Il coinvolgimento di Fyn è stato dimostrato anche nelle neoplasie ematologiche, tra cui LMC, alcuni tipi di leucemie acute e il mieloma multiplo. In particolare Hck, Lyn e Fyn fosforilano attivamente la regione SH3-SH2 di Bcr-Abl, la TK citoplasmatica costitutivamente attiva che è l'agente eziologico di LMC.

Utilizzando un microarray tissutale, Chandra *et al.* hanno dimostrato che l'espressione di Fyn è significativamente aumentata nella fase acuta di LMC rispetto alla fase cronica. Le cellule che sovraesprimono Bcr-Abl *in vitro* e *in vivo* mostrano una sovraespressione della proteina Fyn e del suo mRNA. Inoltre, l'inibizione di Fyn con shRNA rallenta la crescita delle cellule leucemiche e inibisce la clonogenicità dimostrando che Fyn media la proliferazione delle cellule di LMC [64].

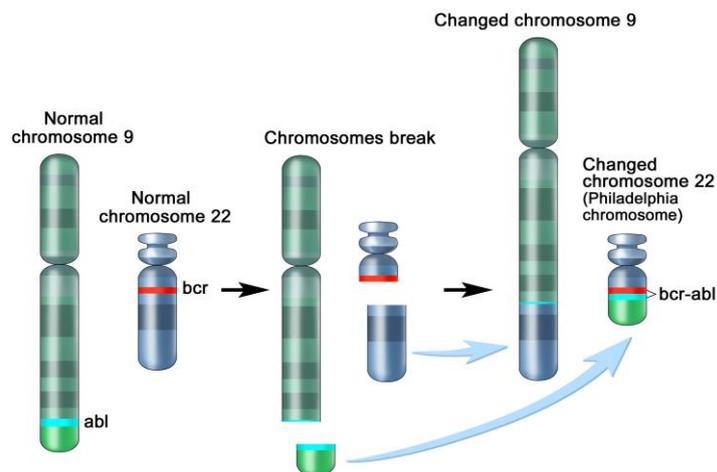
Gli autori hanno anche proposto un meccanismo che spiega i livelli elevati di Fyn nelle cellule di LMC: Bcr-Abl è una delle diverse oncoproteine che aumentano la concentrazione di ROS (reactive oxygen species, specie reattive dell'ossigeno); le ROS sono a loro volta responsabili della sovraregolazione dei livelli di mRNA e di Fyn. Fyn, quindi, è stato individuato come bersaglio per il trattamento di leucemie linfoblastiche acute (ALLs, acute lymphoblastic leukemias) che esprimono Bcr-Abl; infatti insieme a IL-15, il gene Fyn mostra elevata importanza biologica nei fattori coinvolti nella proliferazione di blasti leucemici maligni [33,65].

#### **1.4 Bcr-Abl e LMC**

Abl è una nRTK che presenta un ruolo predominante nella patogenesi della LMC. Condivide molte omologie di sequenza con Src e possiede somiglianze strutturali con gran parte delle SFKs. Abl è localizzata in molti siti subcellulari, quali il nucleo, il citoplasma, i mitocondri ed il reticolo endoplasmatico, dove interagisce con numerose proteine cellulari, tra cui adattatori del segnale, chinasi, fosfatasi, regolatori del ciclo cellulare, fattori di trascrizione e proteine del citoscheletro.

La proteina di fusione Bcr-Abl è risultata essere l'agente eziologico della LMC, infatti mostra un'attività chinastica costitutivamente attivata in tale patologia. Bcr-Abl è codificata dal gene di fusione Bcr-Abl, derivante da una reciproca traslocazione tra il cromosoma 9 (dove si

trova il gene che codifica per Abl) e il cromosoma 22 (dove si trova il gene che codifica per Bcr – breakpoint cluster region) [66]. Questa traslocazione genera un cromosoma definito cromosoma Philadelphia (Ph), che è presente in oltre il 90% di pazienti con LMC e in circa il 10% di pazienti con ALLs [67] (**Fig.4**).



**Fig.4** Rappresentazione della formazione del gene Bcr-Abl.

Bcr-Abl è responsabile delle anomalie fenotipiche della fase cronica di LMC e il segnale mediato da Bcr-Abl è anche associato a difetti di riparazione del DNA da cui derivano ulteriori alterazioni cromosomiche e mutazioni che possono in parte spiegare la natura aggressiva della fase avanzata di LMC [68]. Bcr-Abl rappresenta quindi il target chiave per il trattamento della LMC [69].

A causa dell'alta omologia strutturale tra Src e Abl (con un'identità della sequenza proteica del 47% nei domini catalitici di Src e Abl), parecchi composti sintetizzati originariamente come inibitori di Src hanno anche dimostrato essere potenti inibitori di Bcr-Abl, utili nel superare l'insorgenza di alcuni tipi di resistenza ai farmaci che inibiscono soltanto Bcr-Abl. Negli ultimi anni, gli eccellenti risultati clinici e l'osservazione che inibitori doppi Src/Bcr-Abl o multi-target potrebbero risultare più utili rispetto agli inibitori selettivi hanno incoraggiato lo sviluppo di tali composti. Infatti, anche se un inibitore selettivo riduce il

rischio di effetti indesiderati, i composti multi-target, inibendo diversi percorsi cellulari o i meccanismi compensativi, potrebbero essere più efficaci rispetto agli inibitori selettivi, in particolare nei tumori, dove spesso risultano attivate diverse vie enzimatiche.

La maggior parte degli inibitori doppi Src/Abl sono inibitori di tipo I ATP-competitivi e legano la forma attiva della chinasi. Anche gli inibitori di tipo II sono ATP competitivi, ma legano la forma inattiva. Molti inibitori di tipo II sfruttano inoltre un sito di legame allosterico, vicino al sito catalitico. Questo sito allosterico è disponibile solo nella forma inattiva della chinasi [70,71]. Per gli inibitori chinasi ATP-competitivi è fondamentale un amminoacido, detto "*gatekeeper*" che si trova nella regione che collega il lobo N-terminale e quello C-terminale del sito catalitico. [72,73]. Mutazioni del *gatekeeper*, in particolare la mutazione T315I (sostituzione della Thr315 con Ile) in Abl, giocano un ruolo essenziale nell'insorgenza della resistenza dell'enzima agli inibitori [74].

## **1.5 Inibitori di SFKs e Bcr-Abl**

Le chinasi, grazie al loro ruolo nella trasduzione del segnale e nella regolazione di molte attività cellulari, rappresentano target farmacologici promettenti per il trattamento di svariate malattie.

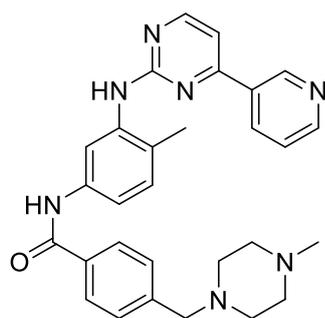
L'importanza delle reazioni di fosforilazione ad opera di chinasi risale agli anni '80. Furono poi descritti i primi inibitori dell'EGFR che diedero inizio ad una vera e propria strategia di sintesi di inibitori [75]. Da quel momento gli studi scientifici su chinasi e loro inibitori sono cresciuti esponenzialmente (circa 500'000 nel 2019) e hanno permesso di identificare un ampio numero di inibitori di TK (TKIs).

La Food and Drug Administration (FDA), al 22 giugno 2020, ha approvato 61 molecole a basso peso molecolare (small molecules) inibitori di TK, di cui la maggior parte attive per somministrazione orale e circa 231 differenti inibitori di TK rientrano in trial clinici mondiali

[76]. Delle 61 molecole approvate, la maggioranza inibisce RTKs, 10 inibiscono le nRTKs, 13 sono dirette alle serina- treonina proteina chinasi e almeno 30 di questi farmaci sono inibitori multichinasici. I dati indicano che 51 inibitori di TK sono mirati contro i tumori, in particolare, 41 contro tumori solidi, e 10 contro tumori ematologici.

La maggior parte di queste molecole contengono strutture eterocicliche quali chinazoline, chinoline, isochinoline, pirimidine e indoli. Gli inibitori di TK rappresentano un passo importante verso la terapia mirata e verso una generazione di antitumorali che ha il vantaggio di evitare alcuni degli effetti avversi associati alla chemioterapia citotossica [77].

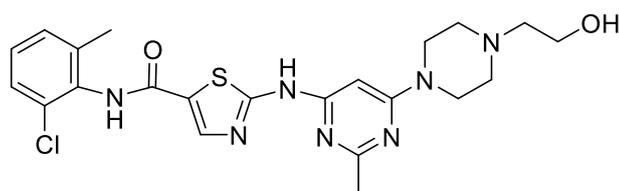
### 1.5.1 Imatinib



**1** imatinib

L'approvazione da parte dell'FDA nel 2001 dell'imatinib **1** (Gleevec<sup>®</sup>, Novartis), inibitore multi chinasico, per il trattamento dei pazienti con LMC è stato non solo una svolta nella terapia bersaglio, ma anche una spinta per la successiva ricerca in questo campo. Anche lo sviluppo di resistenze a questo farmaco, che a volte si manifestava nelle fasi avanzate della malattia, ha reso necessaria la continua ricerca di nuove molecole in grado di superare le resistenze che si erano evidenziate [77].

## 1.5.2 Dasatinib



2 dasatinib

Dasatinib **2** (Sprycel<sup>®</sup> BMS-354825, Bristol-Myers Squibb), è una 2-(amminopirimidinil)tiazolo-5-carbossammide che agisce con meccanismo ATP competitivo, oralmente attivo. E' stato approvato nel 2006 dall'FDA come inibitore di Src/Abl in pazienti con LMC o ALL Ph<sup>+</sup>. È il più studiato tra gli inibitori Src/Abl e ha dimostrato una potenza 325 volte superiore nell'inibizione di Bcr-Abl rispetto all'imatinib.

Non è selettivo, in quanto inibisce una serie di TKs a valle di Bcr-Abl tra cui Lck, Fyn, Yes c-Kit, EphA2 (ephrin type-A receptor 2) e PDGFR. Rappresenta un'importante opzione come trattamento di prima scelta di pazienti con LMC in fase cronica e per pazienti resistenti o intolleranti all'imatinib affetti da LMC in fase avanzata o da ALL Ph<sup>+</sup>.

Inoltre studi clinici dimostrano l'attività di dasatinib in svariati tumori solidi: tumore della prostata resistente alla castrazione [78], tumore della mammella con recettori ormonali positivi [79] e NSCLC (non-small-cell lung cancer, tumore polmonare non a piccole cellule) [80]. Sono stati effettuati anche diversi studi sull'applicazione del dasatinib per il trattamento di altri tumori solidi e leucemia nei bambini. Attualmente sono in corso molti studi di fase 1 e 2 che valutano il dasatinib in associazione ad altri composti per la terapia di altri tumori, tra cui il melanoma, il cancro del colon retto ed il glioblastoma.

Uno studio clinico di fase III (NCT00481247) ha dimostrato che il dasatinib, somministrato una volta al giorno in un paziente con LMC in fase cronica (CP, chronic-phase) (la prima fase della malattia, seguita da una fase accelerata (AP, accelerated phase) e culminante in una crisi blastica (BC, blast crisis) fatale) [81] induce tassi significativamente più alti e più rapidi di

completa risposta citogenetica e maggiore risposta molecolare rispetto all'imatinib. Poiché il raggiungimento di una risposta citogenetica completa entro 12 mesi è stato associato a una migliore sopravvivenza libera da progressione, gli autori hanno concluso che il dasatinib può migliorare gli esiti a lungo termine di questi pazienti [82,83]. È stato anche riportato uno studio clinico di fase II per il trattamento di pazienti AP-LMC resistenti o intolleranti all'imatinib che di solito hanno opzioni terapeutiche limitate. Inoltre, Li *et al.* hanno segnalato che il dasatinib è più efficace nel trattamento di CP-LMC rispetto a AP-LMC [78]. Il miglioramento dell'attività del dasatinib, rispetto all'imatinib, su alcune forme di LMC resistente all'imatinib è dovuto molto probabilmente alla sua maggiore potenza su Abl, piuttosto che alla sua attività su Src.

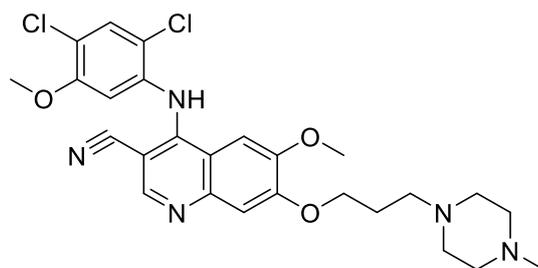
È stato dimostrato che il dasatinib può attraversare la barriera emato-encefalica, per questo motivo possiede un potenziale terapeutico promettente nella gestione della malattia leucemica intracranica e una sostanziale attività clinica in pazienti che manifestano patologie del SNC durante la terapia con l'imatinib [84].

E' stato indagato anche il possibile uso del dasatinib da solo o in associazione nella terapia del carcinoma mammario. Pichot *et al.* hanno riferito che il trattamento in associazione di dasatinib con doxorubicina provoca un'inibizione sinergica della crescita cellulare di carcinoma mammario e blocca la migrazione e la metastatizzazione, suggerendo questa associazione come promettente trattamento multidrug dei tumori al seno invasivi [85].

Studi clinici di fase II hanno mostrato che il dasatinib presenta solo una modesta attività clinica in monoterapia, sia nel carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC, small-cell lung cancer) [86], sia in NSCLC [87]. In quest'ultima patologia, la combinazione di dasatinib ed erlotinib, un inibitore di EGFR, ha mostrato maggiore efficacia. Un'altra interessante associazione è quella del dasatinib e curcumina per il trattamento del cancro del colon-retto. [88]. Morton *et al.* hanno mostrato che il dasatinib può inibire l'invasione e la migrazione

delle cellule dell'adenocarcinoma duttale pancreatico *in vitro* e lo sviluppo di metastasi *in vivo*, suggerendo che il composto potrebbe essere valutato ulteriormente come monoterapia [89,90].

### 1.5.3 Bosutinib



**3** bosutinib

Bosutinib **3** (Bosulif® SKI-606, Wyeth) è un 4-anilino-3-chinolinocarbonitrile, potente inibitore di Bcr-Abl, Src, Lyn, Hck, c-Kit, e PDGFR approvato dall'FDA nel 2012 per il trattamento di LMC Ph<sup>+</sup> e ALL Ph<sup>+</sup>. Bosutinib è stato messo a punto da Boschelli *et al.* alla Wyeth Pharmaceuticals nel 2001 [91]. È un inibitore di tipo I che agisce con un meccanismo ATP-competitivo e ha dimostrato di essere 200 volte più potente nell'inibizione di Bcr-Abl rispetto all'imatinib. Trials clinici sono in corso per valutare questo farmaco per il trattamento di tumori metastatici solidi in associazione al pemetrexed [92] ed è anche studiato per la sua applicazione in tumori solidi, al seno, alla prostata, tumori pancreatici, polmonari e, più recentemente, cervicali e per il trattamento del GBM [93]. Studi di fase I (NCT00195260) mostrano che il bosutinib è generalmente ben tollerato con effetti avversi prevalentemente gastrointestinali [94].

Il bosutinib ha mostrato valori di IC<sub>50</sub> di 1.2 nM su Src in un saggio enzimatico e di 100 nM nell'inibire la crescita indipendente dall'ancoraggio dei fibroblasti trasformati da Src [95], mentre ha una IC<sub>50</sub> di 1 nM come inibitore di Abl. Inoltre, questo composto inibisce la crescita di tre linee cellulari di LMC che esprimono Bcr-Abl (K562, KU812 e MEG-01) con valori IC<sub>50</sub> rispettivamente di 20, 5, 20 nM.

Il bosutinib riduce significativamente la proliferazione di linee cellulari umane resistenti all'imatinib, ma si è dimostrato inattivo sulla mutazione T315I [96]. L'efficacia clinica del bosutinib nella LMC è stata supportata da numerosi studi clinici. Uno studio randomizzato di fase III (NCT00574873) ha indagato l'efficacia del bosutinib rispetto all'imatinib in pazienti con CP-LMC di nuova diagnosi. I risultati hanno mostrato che i tassi di risposta citogenetica completa non differivano significativamente tra bosutinib e imatinib (rispettivamente 70 vs 68%), mentre il tasso di risposta molecolare maggiore a 12 mesi ha raggiunto una significatività statistica (rispettivamente 39 contro 26%) [97].

In uno studio clinico di fase II (NCT00319254), il bosutinib ha mostrato una promettente efficacia nel prolungare la progressione temporale nei pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato o metastatico pretrattati con chemioterapia.

Numerosi studi clinici hanno anche valutato il bosutinib nella terapia di associazione. Uno studio clinico di fase II (NCT00793546) ha studiato il bosutinib in combinazione con exemestano come trattamento di seconda linea per carcinoma mammario avanzato o metastatico ER+/PgR+/erbB2 nelle donne in postmenopausa. È stato anche riportato uno studio clinico di fase I/II (NCT00959946) che analizza il bosutinib in associazione con capecitabina, in cui sono state valutate la sicurezza e l'attività antitumorale preliminare di questa combinazione come trattamento per diversi tipi di tumori e in particolare nel trattamento del carcinoma mammario. Hebbard *et al.* hanno studiato il bosutinib in un modello murino transgenico di carcinoma mammario: hanno scoperto che il trattamento con il composto ha soppresso sia le prime fasi iperplastiche della malattia sia lo sviluppo del tumore. Inoltre, bosutinib rallenta la crescita del cancro inducendo la differenziazione displastica delle cellule tumorali e alterando l'organizzazione vascolare [98].

Boschelli *et al.* hanno presentato uno studio volto ad ampliare l'uso del bosutinib nei pazienti con carcinoma prostatico, da solo o in combinazione con altri agenti antitumorali e nella

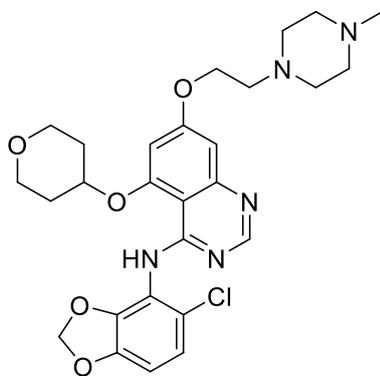
prevenzione delle metastasi scheletriche. Hanno osservato che il bosutinib riduce l'attivazione di Src, la proliferazione cellulare, la migrazione e l'invasione *in vitro* e riduce il volume del tumore *in vivo*, con una riduzione significativa (50%) nell'area della lesione scheletrica sperimentale, fornendo prove convincenti per valutare la sua efficacia nei pazienti con carcinoma della prostata [99].

È stato dimostrato che Src è iperespresso e/o iperattivato nel carcinoma polmonare. I risultati preliminari dimostrano che gli inibitori di Src, come dasatinib e bosutinib, presentano un profilo di sicurezza favorevole e attività antitumorale nei pazienti con carcinoma polmonare. Interessante, quindi, la valutazione della loro combinazione con chemioterapia citotossica, altre terapie mirate e radioterapia [100].

Bosutinib è stato anche studiato come agente antiproliferativo su linee cellulari di carcinoma cervicale, testato rispetto al gefitinib, un inibitore dell'EGFR. Il bosutinib, diversamente dal gefitinib, inibisce anche le vie di segnalazione coinvolte nella regolazione della migrazione delle cellule tumorali attraverso l'alterazione della  $\beta$ -catenina, suggerendo che potrebbe essere un promettente agente terapeutico per il cancro cervicale [90,101].

Altri studi su questa molecola sono tuttora in corso.

#### 1.5.4 Saracatinib



4 saracatinib

L'anilino-chinazolina saracatinib **4**, (AZD0530) è un potente doppio inibitore di Src/Abl di tipo I. E' stato prodotto da AstraZeneca, è disponibile per via orale ed è attivo nell'intervallo basso nanomolare contro entrambi gli enzimi, inibendo Src e Abl con un valore di IC<sub>50</sub> rispettivamente di 2.7 e 30 nM [102].

È stato evidenziato che il saracatinib inibisce specificatamente la crescita delle linee cellulari LMC e ALL Ph<sup>+</sup>, ma non quelle Ph<sup>-</sup>, che non presentano il cromosoma Philadelphia; probabilmente il suo effetto antiproliferativo deriva dall'inibizione di entrambe le chinasi Src e Bcr-Abl, con conseguente iporegolazione delle vie di segnalazione della sopravvivenza (STAT5, Erk, PI3K/Akt) nelle cellule Ph<sup>+</sup>, resistenti o sensibili a imatinib. E' stato osservato che il composto può fornire benefici clinici prevenendo o ritardando la progressione del tumore attraverso l'inibizione della migrazione e dell'invasione delle cellule tumorali, piuttosto che mediante riduzione della crescita tumorale primaria [102]. Tuttavia, i ricercatori di AstraZeneca hanno riferito che l'attività del saracatinib su Abl non è attualmente considerata sufficiente per poter proseguire gli studi clinici nelle leucemie dipendenti da Bcr-Abl.

Numerosi studi clinici hanno valutato il saracatinib per il trattamento di diversi tumori solidi, avanzati e metastatici, tra cui NSCLC e osteosarcoma, tumori alla mammella, prostata, pancreas, colon-retto, testa e collo, da solo o in combinazione con agenti chemioterapici convenzionali.

Il saracatinib inibisce l'attività di Src in diverse linee cellulari di carcinoma mammario e sopprime la natura mobile e invasiva delle cellule cancerose mammarie. Inoltre, il trattamento di queste cellule con il saracatinib in combinazione con tamoxifene comporta una riduzione dell'attività di Src e Fak, insieme a una completa abrogazione del loro comportamento invasivo *in vitro* [103]. Il saracatinib è stato testato da solo o in associazione con il cediranib, un potente inibitore di VEGFR, in pazienti con carcinoma mammario metastatico o avanzato

e, da solo o in combinazione, per il trattamento di altri tumori femminili, per esempio il carcinoma ovarico.

Il saracatinib è anche attivo nel carcinoma prostatico: uno studio clinico di fase II (NCT01267266), concluso nel novembre del 2013, ha dimostrato l'efficacia del composto nel trattamento dei pazienti con carcinoma prostatico resistente alla castrazione.

Il saracatinib è un potente inibitore della migrazione e dell'invasione delle cellule tumorali polmonari; migliora l'inibizione di Akt e la sensibilità alla radioterapia. Questa osservazione ha indicato che la molecola può anche ridurre la resistenza delle cellule tumorali polmonari ai segnali proapoptotici, per cui questa molecola viene sperimentata in combinazione con radioterapia e chemioterapia [104].

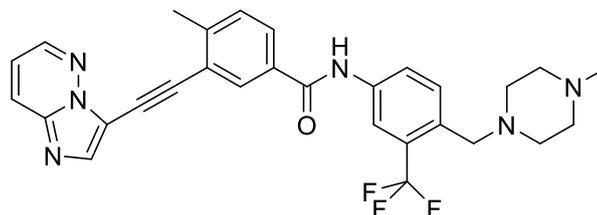
Poiché Src è coinvolto nell'attività osteoclastica, è stato anche studiato il potenziale uso del saracatinib nelle malattie ossee. Studi clinici di fase I hanno dimostrato che il composto ha ridotto il riassorbimento osseo osteoclastico in uomini sani [105] e in pazienti con cancro [106]. De Vries *et al.* hanno dimostrato che il saracatinib previene in modo reversibile la migrazione dei precursori degli osteoclasti dallo strato di osteoblasti alla superficie ossea e la conseguente formazione di anelli di actina e fosse di riassorbimento. Questi dati rendono il saracatinib un candidato promettente per mitigare la degradazione ossea osteoclastica nelle malattie ossee [107]. Di conseguenza, diverse indagini hanno valutato il possibile uso del composto, da solo o in l'associazione con acido zoledronico, per il trattamento di metastasi ossee, frequenti nei tumori solidi, come tumori al seno e alla prostata (65-75%) e carcinoma polmonare (30-40%).

Schweppe *et al.* hanno dimostrato che il saracatinib è anche attivo nel trattamento del carcinoma papillare e anaplastico della tiroide [108].

Uno studio clinico di fase II (NCT00513435) ha riportato che il trattamento con saracatinib come singolo agente in tumori della testa e del collo, ricorrenti o metastatici, non merita

ulteriori studi, in quanto il composto non è risultato attivo [90,109]. Altri studi sulla molecola sono tuttora in corso.

### 1.5.5 Ponatinib



5 ponatinib

Il ponatinib **5** (Inclusig<sup>®</sup> AP24534, Ariad Pharmaceuticals) è un imidazo[1,2-*b*]piridazina sintetizzata dai ricercatori di Ariad Pharmaceuticals.

Il ponatinib, approvato dall'FDA nel 2012 per il trattamento della LMC refrattaria ad altri farmaci, è un inibitore multi-target. Il composto è stato temporaneamente ritirato dal commercio perché causa eventi trombotici gravi in alcuni pazienti. Nel 2014 è stato reintrodotta sul mercato perché è l'unica molecola attiva sulle forme con mutazione Bcr-Abl T315I. E' stata aggiunta l'avvertenza di possibili gravi effetti trombotici.

Nel 2015 è stato approvato anche dall'Agenzia europea per i medicinali (EMA, European Medicines Agency).

Tra le altre chinasi inibisce potentemente Src ( $IC_{50} = 4$  nM) e Bcr-Abl; in particolare, blocca Bcr-Abl nella sua forma wild-type (senza mutazioni) ( $IC_{50} = 0.37$  nM), Bcr-Abl T315I ( $IC_{50} = 2.0$  nM) e altri mutanti del dominio della chinasi Bcr-Abl ( $IC_{50} = 0.30-0.44$  nM). Nei test cellulari e biochimici ha mostrato attività inibitoria contro varie chinasi implicate nella patogenesi di neoplasie ematologiche, tra cui FLT3 e c-Kit. Il ponatinib inibisce anche i membri delle famiglie di TK recettoriali VEGFR, FGFR e PDGFR [110].

L'attività di ponatinib contro FLT3-internal tandem duplication (ITD) [111], un insieme di mutazioni di FLT3 riscontrate nel 30% dei pazienti con leucemia mieloide acuta (AML, acute myeloid leukemia) è terapeuticamente importante. Nelle cellule MV4-11 (FLT3-ITD [+/+]), il

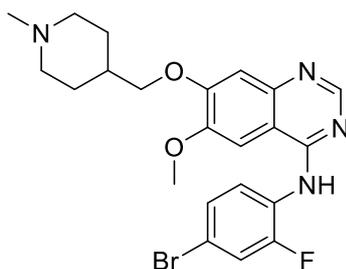
ponatinib inibisce FLT3 mutato ed i segnali a valle di questa chinasi e induce apoptosi a concentrazioni inferiori a 10 nM. È stato dimostrato che il composto è inattivo su cellule e campioni clinici che esprimono FLT3 senza mutazioni. Complessivamente, questi risultati supportano lo studio di ponatinib in pazienti con AML che esprimono FLT3-ITD [112].

Uno studio clinico di fase II (NCT01207440), concluso nel gennaio 2019, ha confermato l'efficacia del composto in pazienti con LMC o con Ph<sup>+</sup> ALL resistenti o intolleranti al dasatinib o al nilotinib o che presentano la mutazione T315I. Infine, un altro studio di fase II (NCT01424982), attualmente in corso, sta valutando l'uso della chemioterapia intensiva in combinazione con il ponatinib nel controllo di ALL Ph<sup>+</sup>.

Il ponatinib è un farmaco molto promettente per il trattamento di LMC, il che può essere attribuito alla sua capacità di inibire la mutazione gatekeeper T315I e anche al fatto che la molecola inibisce un elevato numero di chinasi. È stato dimostrato che le cellule staminali/progenitrici di LMC, responsabili della recidiva della malattia, sono intrinsecamente resistenti agli inibitori di Abl, poiché queste cellule non dipendono dall'attività della chinasi Bcr-Abl per la loro sopravvivenza e si comportano in modo molto diverso dalla popolazione di cellule più mature che sono dipendenti dall'oncogene [113,114].

Inibitori multi-target, incluso il ponatinib, che bloccano percorsi di segnalazione diversi da Bcr-Abl, potrebbero dare buoni risultati nell'eradicazione della popolazione di cellule staminali/progenitrici nella LMC [90].

### 1.5.6 Vandetanib



**6** vandetanib

Il vandetanib **6** (ZD6474) (*N*-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methyl-4-piperidinyl)methoxy]-4-chinazolinammina) è una molecola ATP-competitiva, approvata nel 2011, somministrabile per via orale, utilizzata per il trattamento del carcinoma midollare della tiroide. Il composto inibisce VEGFR-2, EGFR, RET e SFKs [1,115,116]. L'inibizione di queste TK blocca molteplici vie di segnalazione intracellulari coinvolte nella crescita e nella progressione tumorale e nell'angiogenesi [117].

La via di segnalazione VEGF è fondamentale per la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali e per l'induzione della permeabilità vascolare [118,119]. In particolare VEGF è il principale mediatore dell'angiogenesi fisiologica o associata al tumore [119]. Il vandetanib potrebbe produrre un'inibizione più significativa dell'angiogenesi rispetto ad altri agenti selettivi anti-VEGFR, perché ha anche un effetto indiretto sull'angiogenesi, interferendo con la produzione indotta dall'EGFR di fattori di crescita angiogenici [120]. Inoltre è stato dimostrato che gli agenti anti-EGFR bloccano la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, pertanto, l'attività anti-EGFR di vandetanib potrebbe anche comportare un ulteriore meccanismo antiangiogenico diretto.

Studi preclinici hanno suggerito che il blocco contemporaneo di diversi meccanismi coinvolti nella crescita tumorale potrebbe comportare un'inibizione della crescita tumorale più significativa rispetto al blocco di una singola via enzimatica [121]. Le cellule tumorali usano meccanismi diversi per sfuggire all'attività degli agenti citotossici e il blocco di due

meccanismi distinti che contribuiscono alla crescita tumorale, come l'angiogenesi sostenuta dal VEGFR e la proliferazione indotta dall'EGFR può portare a migliori risultati. Studi *in vitro* hanno dimostrato che il vandetanib è un inibitore selettivo della proliferazione cellulare stimolata da VEGF ed EGFR.

Saggi enzimatici hanno dimostrato che il vandetanib è un potente inibitore dell'attività di VEGFR-2 (IC<sub>50</sub> 40 nM) e un inibitore submicromolare di EGFR (IC<sub>50</sub>, 500 nM) [120]. Inoltre, Carlomagno *et al.* [116] hanno dimostrato che il vandetanib inibisce la crescita delle cellule tumorali che sovraesprimono la chinasi oncogenica RET (IC<sub>50</sub>, 100 nM), come le cellule di carcinoma della tiroide.

Studi *in vivo* hanno dimostrato la capacità del vandetanib di inibire la neovascolarizzazione indotta da tumore e la crescita di modelli tumorali umani di diverse origini istologiche: seno, polmone, prostata, colon, ovaio e vulva. L'inibizione dell'angiogenesi svolge un ruolo importante nell'effetto antitumorale del vandetanib, infatti il composto causa una significativa riduzione della densità dei microvasi tumorali in una gamma di tumori impiantati ortotopicamente nel topo o nel ratto, inclusi modelli di carcinoma gastrico [122], pancreatico [123], renale [124] e polmonare [125]. Tali studi confermano che l'attività antitumorale del vandetanib è il risultato dell'inibizione dell'angiogenesi piuttosto che di un effetto antiproliferativo diretto sulle cellule tumorali. Tuttavia, in studi *in vitro* e *in vivo* su un modello di carcinoma polmonare PC-9, recante mutazioni attivanti del gene EGFR, il vandetanib ha indotto una forte regressione del tumore [126], dimostrando anche la sua capacità di inibire la crescita del tumore EGFR-dipendente. Diversi studi hanno suggerito che la combinazione del vandetanib con altre terapie antitumorali può produrre ulteriori benefici terapeutici. Ciardiello *et al.* [127] hanno dimostrato che, in un modello di xenotrapianto di carcinoma del colon, il vandetanib combinato con paclitaxel produce una maggiore inibizione della crescita tumorale rispetto a quella ottenuta con ciascun singolo agente. L'attività

sinergica antiproliferativa è stata anche dimostrata con vandetanib e oxaliplatino nelle linee cellulari di carcinoma del colon-retto umano [128].

Inoltre è stata valutata l'efficacia della combinazione del vandetanib con la radioterapia in modelli di xenotrapianto di carcinoma polmonare. Hoang *et al.* hanno mostrato che l'uso concomitante di vandetanib e radioterapia ha ottenuto effetti antitumorali maggiori rispetto alla sola radioterapia [129]. Infine, studi *in vitro* e *in vivo* su modelli tumorali pancreatici umani hanno mostrato che la combinazione di vandetanib con gemcitabina e radioterapia ha prodotto una maggiore inibizione della crescita tumorale rispetto all'utilizzo della sola gemcitabina [130].

Sono stati pubblicati altri studi di fase I sul vandetanib in associazione con chemioterapia. Nel primo studio, il vandetanib è stato valutato in associazione col pemetrexed come trattamento di seconda linea per i pazienti con NSCLC avanzato [131]. In altri due studi, il vandetanib è stato associato con 5-fluorouracile, leucovorina e irinotecan (FOLFIRI) e 5-fluorouracile, leucovorina e oxaliplatino come trattamento di prima o seconda linea dei pazienti con carcinoma del colon-retto avanzato [132,133]. Questi studi hanno dimostrato che la somministrazione una volta al giorno di vandetanib a dosi fino a 300 mg è ben tollerata, sia come singolo agente che in associazione con chemioterapia, con eventi avversi lievi e attività antitumorale soddisfacente.

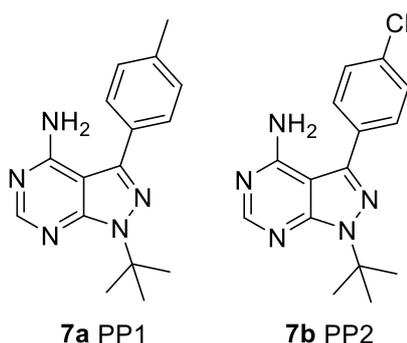
Sono stati poi condotti studi clinici di fase II col vandetanib come singolo agente o in combinazione con chemioterapia in vari di tipi di tumore. Sono stati osservati risultati negativi nel trattamento di SCLC, del carcinoma mammario metastatico e del mieloma multiplo, al contrario, risultati promettenti sono stati evidenziati nel trattamento di NSCLC e del carcinoma midollare della tiroide (MTC, medullary thyroid cancer).

In particolare, è stata condotta un'analisi della potenziale relazione tra i livelli basali di VEGF plasmatici e la sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS, progression-free

survival) in pazienti con NSCLC [134]. I risultati di questa analisi suggeriscono che bassi livelli basali di VEGF circolante possono essere predittivi di un vantaggio di PFS in pazienti con NSCLC che ricevono monoterapia con vandetanib (300 mg), rispetto a gefitinib o paclitaxel e carboplatino o vandetanib (100 mg) in associazione con docetaxel rispetto al solo docetaxel.

Dati promettenti sono stati riportati anche con vandetanib nel trattamento del MTC. Wells *et al.* [135] hanno studiato il farmaco in pazienti con MTC localmente avanzato o metastatico, per i quali l'attivazione della TK RET è il principale evento oncogenico e i risultati hanno evidenziato una stabilizzazione a lungo termine della malattia [136].

### 1.5.7 PP1 e PP2

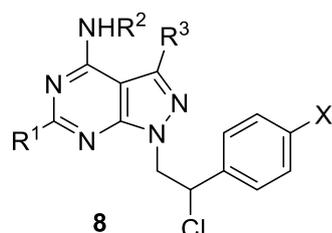


Le pirazolo[3,4-*d*]pirimidine PP1 **7a** e PP2 **7b** sintetizzati alla Pfizer, sono stati i primi doppi inibitori riportati in letteratura. Essi hanno dimostrato valori IC<sub>50</sub> di circa 1 μM e 0.5 μM, per Src e 0.3 μM e 0.5 μM, per Abl [137]. Sono stati scoperti durante un programma volto alla ricerca di inibitori specifici delle SFKs; solo più tardi è emersa l'attività verso Abl aprendo un nuovo campo di ricerca [138]. Le pirazolo pirimidine PP1 e PP2 sono state i primi inibitori molecolari che potessero essere realmente classificati come selettivi per le SFKs e sono risultati importanti come prodotti di riferimento per la sintesi di nuove molecole destinate all'inibizione delle SFKs [139,140] per molti anni, tuttavia sono molecole tossiche e non sono state ulteriormente sviluppate come agenti terapeutici.

La loro attività è comunque ancora oggetto di indagine, come dimostrano diversi articoli scientifici tra cui quello pubblicato da Kong *et al.* che ha dimostrato che PP2 ha ridotto efficacemente la proliferazione delle cellule tumorali cervicali, inibendo l'attività di Src e di EGFR, coinvolti con ruoli diversi in questo tipo di tumore [90,141].

## 2. PROGETTO

Il gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale ha sintetizzato un'ampia libreria di molecole a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica 4-ammino-sostituita **8** attive come inibitori delle tirosina chinasi citoplasmatiche Bcr-Abl, Src e/o Fyn. Questi composti presentano una catena 2-cloro-2-feniletilica sull'N1 pirazolico, un atomo di idrogeno o un anello aromatico in C3, e un idrogeno o sostituenti tioalchilici sulla posizione C6 dell'anello pirimidinico [142,143]. Inoltre, per molti composti sono stati sintetizzati gli analoghi alogenati sulla posizione *para* dell'anello benzenico della catena in N1, in modo da ampliare gli studi di relazione struttura-attività (SAR).

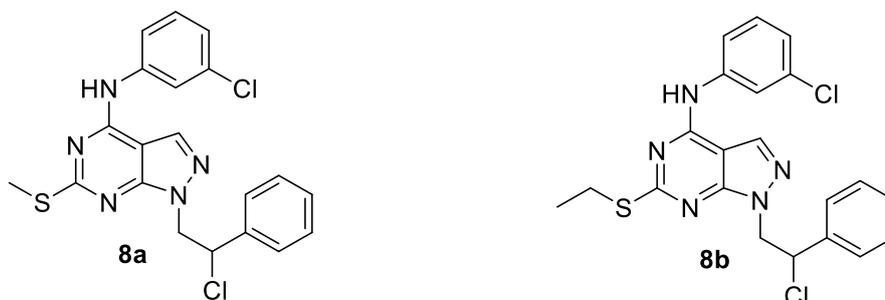


R<sup>1</sup> = H o sostituenti tioalchilici  
 R<sup>2</sup> = H o gruppi alifatici o aromatici  
 R<sup>3</sup> = H o sostituenti aromatici  
 X = H, F, Cl, Br

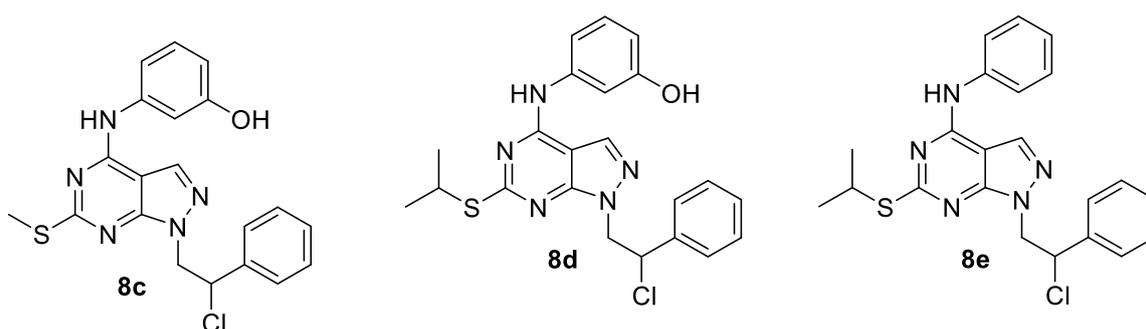
Test sugli enzimi isolati hanno mostrato che molti di questi composti sono attivi verso Bcr-Abl, Src e/o Fyn, con valori di attività nel range submicro o nanomolare; inoltre alcuni composti sono risultati attivi in diversi modelli tumorali *in vivo* [142,143].

All'interno della libreria, alcune molecole 6-tioalchil sostituite sono risultate ottimi inibitori di Src. In particolare, i composti **8a** e **8b**, che presentano in C6 rispettivamente un metile e un etile e in C4 un'anilina meta cloro sostituita, hanno un valore di K<sub>i</sub> verso Src rispettivamente di

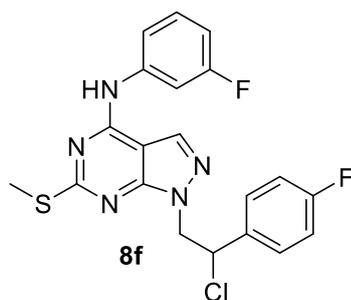
0.6 e 0.5  $\mu\text{M}$ . Entrambi risultano in grado di inibire la proliferazione delle cellule di osteosarcoma umano *in vitro* e inoltre **8a** è stato testato *in vivo* su un modello di tumore xenotrapianto umano SaOS-2 in topi, ottenendo una buona riduzione del peso e del volume del tumore stesso [144].



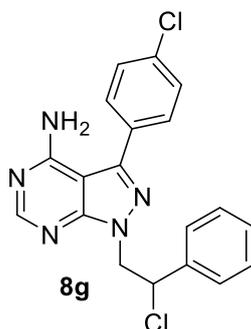
Altri inibitori di Src 6-tioalchil sostituiti e recanti in C4 un gruppo anilिनico hanno mostrato attività *in vivo* nei confronti del neuroblastoma. Come ad esempio i composti **8c**, **8d** e **8e** che presentano valori di  $K_i$  verso Src rispettivamente pari a 0.03, 0.01 e 0.3  $\mu\text{M}$ . Tra questi, le molecole **8c** e **8d** sono anche attive su Abl con un valore di  $K_i$  rispettivamente di 0.15 e 0.12  $\mu\text{M}$  e risultano, quindi, ottimi dual inhibitors [143].



Tra i dual inhibitors troviamo anche il composto **8f**, caratterizzato dalla presenza di un fluoro in posizione para sull'anello fenilico della catena 2-cloro-2-feniletilica sull'N1 pirazolico, che possiede valori di  $K_i$  di 0.22  $\mu\text{M}$  verso Abl e di 0.21  $\mu\text{M}$  verso Src [145].



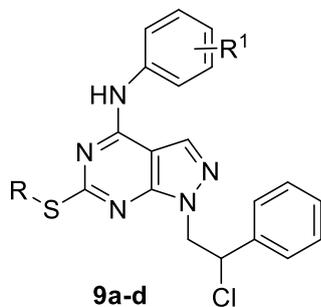
Risultano, invece, interessanti inibitori di Fyn composti recanti un anello aromatico in C3, un gruppo amminico primario in C4 e un idrogeno in C6. Alcuni di questi composti hanno mostrato attività antiproliferativa su linee cellulari K562 di leucemia mieloide cronica, MDA-MD-231 di carcinoma mammario e U87 di glioblastoma multiforme e, inoltre, sono risultati in grado di inibire la fosforilazione della proteina Tau in un modello cellulare di Alzheimer. Tra i composti più significativi ricordiamo il composto **8g**, il cui valore di  $K_i$  verso Fyn è di  $0.07 \mu\text{M}$  e la cui  $\text{IC}_{50}$  verso la linea cellulare leucemica K562 è di  $0.56 \mu\text{M}$  [146].



Sulla base degli ottimi risultati ottenuti, si è progettato razionalmente un piccolo set di nuovi derivati introducendo mutazioni puntiformi rispetto ai composti di precedente sintesi e dotati di buona attività **8a,b**. Questo lavoro è stato strutturato in modo da valutare l'effetto di piccole variazioni sulle decorazioni dello scaffold pirazolo-pirimidinico, in modo da ampliare ulteriormente la libreria di composti e la nostra conoscenza della SAR. In particolare, partendo dal composto **8a**, attivo *in vivo*, si sono sintetizzati gli analoghi **9a** e **9b**, cambiando la posizione del cloro sull'anello anilिनico, e il derivato **9d** introducendo un alchile ramificato

al posto del metile in C6. Il derivato **9c** si è invece progettato partendo dal suo analogo meta cloro anilिनico **8b**.

Oggetto della mia tesi sperimentale di laurea è, quindi, la sintesi dei composti **9a-d**.



**9a:** R = CH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> = 2Cl

**9b:** R = CH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> = 4Cl

**9c:** R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sup>1</sup> = H

**9d:** R = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>1</sup> = 3Cl

### 3. DISCUSSIONE

#### 3.1 Chimica

Il composto di partenza per la sintesi dei derivati **9a-d** è l'1-fenil-2-idrazino etanolo **10**, ottenuto per reazione dell'idrazina monoidrata con ossido di stirene a 100 °C.

Trattando quindi l'1-fenil-2-idrazino etanolo **10** con etossimetilencianoacetato di etile a 70-80 °C in toluene anidro per 8 h, si ottiene con ottima resa il 5-ammino-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **11**.

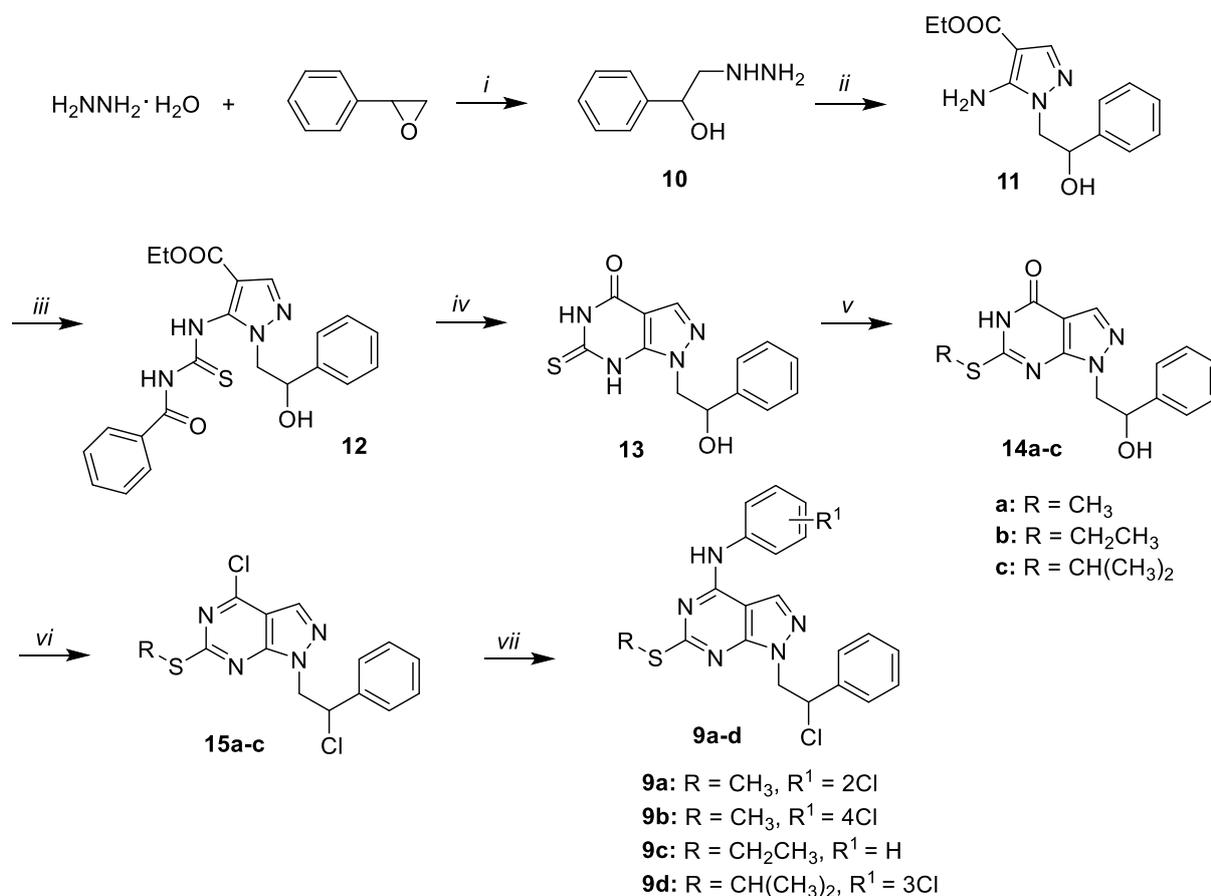
Quest'ultimo, per reazione con benzoil isotiocianato in tetraidrofurano (THF) anidro, porta alla formazione del 5-[[benzoilammino]carbonotioil]ammino}-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **12**, che viene successivamente trattato con idrossido di sodio. Per precipitazione con acido acetico glaciale si ottiene il derivato ciclizzato 1-(2-idrossi-2-feniletil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **13** con ottima resa.

Il composto **13** viene quindi alchilato sullo zolfo in 6 mediante reazione con l'opportuno alogenuro alchilico. In particolare, la reazione di **13** con l'opportuno ioduro alchilico in THF anidro per 12h, porta ai derivati 6-alchil 1-(2-feniletil-2-idrossi)-1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-onici **14a,b**; mentre il composto **14c** viene ottenuto facendo reagire **13** con il 2-bromopropano in presenza di K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in *N,N*-dimetilformammide (DMF) anidra a temperatura ambiente per 8h.

Gli intermedi **14a-c** vengono sottoposti a reazione di clorurazione utilizzando il complesso di Vilsmeier (POCl<sub>3</sub>/DMF, 1:1) in CHCl<sub>3</sub> a refluxo per 4-8 h portando alla formazione dei derivati 6-tioalchil 4-cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici **15a-c**.

Infine, la reazione di **15a-c** con un eccesso delle opportune aniline in EtOH assoluto a refluxo per 3-5 h porta ai derivati 4-ammino sostituiti **9a-d** (Schema I).

**Schema I. Sintesi dei composti 9a-d.<sup>a</sup>**



<sup>a</sup> **Reagenti e condizioni:** (i) riflusso, 15 min; (ii) etossimetilencianoacetato di etile, toluene 80 °C, 8 h; (iii) benzoyl isotiocianato, THF an., riflusso, 12 h; (iv) NaOH 2N, 100 °C, 10 min, poi AcOH; (v) appropriato ioduro alchilico, THF an., riflusso, 12 h (per ottenere **14a,b**), 2-bromopropano, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF an., t.a., 8 h (per ottenere **14c**); (vi) POCl<sub>3</sub>/DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, riflusso, 4-8 h; (vii) appropriata anilina, EtOH ass., riflusso, 3-5 h.

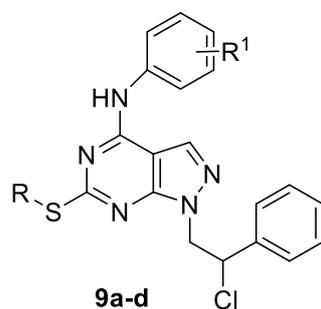
## 3.2 Biologia

### Test enzimatici sulle chinasi isolate Fyn, Src e Abl

I composti sono stati testati sugli enzimi isolati Fyn, Src e Abl dal gruppo del Dott. Maga presso il CNR di Pavia. Si è pensato fosse interessante valutare l'attività dei composti su un piccolo panel di chinasi, sia per l'elevata omologia tra i membri delle tirosina chinasi citoplasmatiche, sia perché molte molecole della libreria in-house sono attive su Fyn, Src e/o Abl. Il meccanismo di inibizione dell'attività chinasica è stato studiato usando Fyn/Src/Abl ricombinante. L'affinità verso gli enzimi è stata misurata in un test di binding utilizzando il peptide substrato specifico per Fyn/Src/Abl e [ $\gamma$ 32P]ATP. Ogni esperimento è stato eseguito almeno in duplicato e i valori medi sono stati usati per l'interpolazione.

In **Tabella 1** sono riportati i valori di attività verso Fyn, Src e Abl espressi come percentuale d'inibizione alle concentrazioni di 10 e 1  $\mu$ M. Inoltre, per i composti più attivi è stata calcolata la  $K_i$  espressa in micromolare.

**Tabella 1.** Attività enzimatica dei composti **9a-d** verso Fyn, Abl e Src. Il composto **8a** è riportato come riferimento.



cpd	R	R <sub>1</sub>	inibizione Abl			inibizione Src			inibizione Fyn		
			% a 10 μM	% a 1 μM	K <sub>i</sub> (μM)	% a 10 μM	% a 1 μM	K <sub>i</sub> (μM)	% a 10 μM	% a 1 μM	K <sub>i</sub> (μM)
<b>8a</b>	CH <sub>3</sub>	3Cl	ND	ND	0.6	ND	ND	0.6	ND	ND	ND
<b>9a</b>	CH <sub>3</sub>	2Cl	72	ND	0.163	90	ND	0.030	90.7	ND	0.155
<b>9b</b>	CH <sub>3</sub>	4Cl	23	NA	ND	NA	24	ND	NA	NA	ND
<b>9c</b>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	35	18	>10	27	16	>10	64	33	1.967
<b>9d</b>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3Cl	24	NA	ND	34	ND	ND	8	ND	ND

ND = non determinato

NA = non attivo

## 4. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi sperimentale ha portato alla sintesi di una piccola libreria di composti **9a-d**, che sono stati testati in un saggio enzimatico preliminare sulle chinasi Fyn, Src e Abl.

I dati riportati in **Tabella 1** ci permettono di effettuare una valutazione preliminare della SAR all'interno di questa nuova serie di molecole.

Per quanto riguarda l'effetto delle sostituzioni in C4, possiamo confrontare il composto di precedente sintesi **8a**, recante in C4 la meta cloroanilina, con i nuovi derivati **9a** e **9b** che presentano in C4 rispettivamente l'orto cloroanilina e la para cloroanilina. Si può notare che il derivato orto cloro anilinicò è il più attivo della serie. Infatti questo composto possiede valori di  $K_i$  di 163, 30 e 155 nM verso Abl, Src e Fyn, rispettivamente. Inoltre, **9a** è anche 20 e 4 volte più attivo verso Src e Abl rispetto al suo derivato di precedente sintesi **8a**. Infine, dai dati riportati in **Tabella 1**, si evince che anche il composto **9c** è un discreto inibitore di Fyn con una  $K_i$  di 1.967  $\mu$ M.

Con riferimento al sostituito in C6, si può notare che la presenza del gruppo tioisopropilico, più stericamente ingombrato rispetto al metile e all'etile, è generalmente associato a una minor attività enzimatica.

Inoltre, sempre osservando la **Tabella 1**, si può osservare un dato anomalo per quanto riguarda l'attività del composto **9b** su Src. **9b**, infatti, presenta una maggiore attività alla concentrazione 1  $\mu$ M rispetto a quella 10  $\mu$ M, per la quale risulta addirittura inattivo. Questi risultati probabilmente derivano dal fatto che a concentrazioni maggiori si sono riscontrati problemi di solubilità durante l'effettuazione del saggio. Tale problema riguarda molti dei derivati pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici sintetizzati dal gruppo di ricerca e più in generale gli inibitori di chinasi, che infatti vengono spesso formulati come sali. Al fine di superare il limite dello scarso profilo farmacocinetico, il gruppo in cui ho svolto il mio lavoro di tesi ha

già realizzato diversi studi di formulazione su composti di precedente sintesi ottenendo degli ottimi risultati [147,148].

Nel complesso, questo studio costituisce un passo avanti nella ricerca di nuove molecole potenziali inibitori di chinasi, infatti ha portato all'identificazione del composto **9a** che non è solo dotato di un interessante profilo come inibitore multitarget nei confronti di Fyn, Src e Abl, ma è risultato anche 20 volte più attivo nell'inibire Src rispetto al suo analogo di precedente sintesi **8a**. Per questo motivo, **9a** meriterebbe ulteriori approfondimenti e sviluppi. In particolare, sarebbe interessante testare la sua efficacia nei confronti di linee cellulari tumorali che sovraesprimono questa chinasi, quali linee cellulari di osteosarcoma, analogamente al suo derivato di precedente sintesi **8a**, linee cellulari di tumori del SNC come il neuroblastoma, e linee cellulari di tumori ematologici come la LMC per la sua attività di inibitore doppio di Src/Abl.

## 5. PARTE SPERIMENTALE

### 5.1 Chimica

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio BÜCHI B-540.

Gli spettri IR sono stati registrati in KBr, mediante uno spettrofotometro Perkin-Elmer 398.

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati registrati con un apparecchio Varian Gemini 200 (200 MHz); i chemical shifts sono riportati in  $\delta$  (ppm) usando come standard interno il TMS; le  $J$  sono espresse in Hz. L'accoppiamento protonico è stato descritto usando le seguenti abbreviazioni: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, set = settetto, m = multipletto, s all = s allargato.

Gli spettri sono stati registrati in  $\text{CDCl}_3$  o in  $\text{DMSO-d}_6$ .

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.

## Preparazione dell'1-fenil-2-idrazino etanolo 10

Ad idrazina monoidrata (30 mL, 0.6 moli) scaldata a 100 °C si aggiunge goccia a goccia l'ossido di stirene (20 mL, 0.17 moli) mantenendo a leggero riflusso.

Terminata l'aggiunta, si agita ancora 15 minuti e si allontana, sotto vuoto, l'eccesso di idrazina.

Il residuo così ottenuto viene distillato con una pompa ad olio.

Si ottiene un liquido incolore che solidifica lentamente.

P.eb.: 155-158 °C/0.6 mmHg

Resa: 87%

## Preparazione del 5-ammino-1-(2-idrossi-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **11**

Ad una soluzione di etossimetilencianoacetato di etile (3.38 g, 20 mmoli) in toluene anidro (20 mL) viene aggiunto 1-fenil-2-idrazino etanolo **10** (3.04 g, 20 mmoli).

La soluzione così ottenuta viene scaldata a 70-80 °C per 8 h.

Si svapora a circa metà volume e si lascia cristallizzare.

Si ottiene un solido bianco che viene filtrato e ricristallizzato da toluene.

P.f.: 136-137 °C

Resa: 70%

Analisi elementare per C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

P.M. 275.30

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>
<b>Calcolato</b>	61.08	6.22	15.26
<b>Trovato</b>	61.07	6.22	15.31

IR (cm<sup>-1</sup>): 3470-3330 (NH<sub>2</sub>), 3300-3000 (OH), 1685 (C=O).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.01-4.23 (m, 4H, CH<sub>2</sub>N + CH<sub>2</sub>O), 4.96-5.02 (m, 1H, CHO), 5.71 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 6.15 (s all., 2H, NH<sub>2</sub>), 7.28-7.46 (m, 5H Ar), 7.49 (s, 1H, H-3).

## Preparazione del 5-[[benzoiilammino)carbonotioil]ammino]-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **12**

Ad una sospensione di 5-ammino-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **11** (2.75 g, 10 mmoli) in THF anidro (20 mL) si aggiunge in un'unica porzione benzoiil isotiocianato (1.7 g, 11 mmoli).

Si rifluisce 12 h e successivamente si svapora il solvente sotto vuoto.

Il grezzo viene ripreso con dietilere; precipita un solido che viene filtrato e ricristallizzato da etanolo assoluto.

P.f.: 170-172 °C

Resa: 93%

Analisi elementare per C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

P.M. 438.50

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	60.26	5.06	12.78	7.31
<b>Trovato</b>	60.22	5.20	12.95	7.04

IR (cm<sup>-1</sup>): 3221 (NH), 3190-2940 (OH), 1708 (COOEt), 1671 (C=O).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.19 (t, *J* = 7.0, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.13-4.20 (m, 5H, 2CH<sub>2</sub> + OH), 4.58-4.68 (m, 1H, CHO), 7.29-7.33 e 7.54-7.71 (2m, 8H Ar), 7.94 (s, 1H, H-3), 8.04 (m, 2H Ar), 12.12 (s, 1H, NH), 12.21 (s, 1H, NH).

## Preparazione dell' 1-(2-idrossi-2-fenilettil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-one 13

Il composto 5-[[benzoiilammino]carbonioil]ammino}-1-(2-idrossi-2-fenilettil)-1H-pirazolo-4-carbossilato di etile **12** (4.38 g, 10 mmoli) viene sciolto in NaOH 2M (40 mL) e scaldato su bagnomaria bollente per 10 minuti.

La soluzione viene poi diluita con acqua (40 mL), e filtrata a caldo per eliminare eventuali particelle indissolte.

Si lascia raffreddare (eventualmente in frigo). Si acidifica con acido acetico glaciale fino a pH 4. Si lascia a riposo una notte, si filtra e si lava il precipitato con acqua. Si ottiene un solido bianco che viene ricristallizzato da etanolo assoluto.

P.f.: 263-265 °C

Resa: 80%

Analisi elementare per C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

P.M. 288.32

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	54.16	4.20	19.43	11.12
<b>Trovato</b>	54.28	4.27	19.70	11.03

IR (cm<sup>-1</sup>): 3362 (NH), 3142-2773 (OH), 1681 (C=O).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 4.19-4.27 e 4.59-4.65 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.90-4.94 (m, 1H, CHO), 5.66 (s all., 1H, OH), 7.27-7.47 (m, 5H Ar), 7.98 (s, 1H, H-3), 12.19 (s, 1H, NH), 13.40 (s all., 1H, NH).

## Preparazione generale dei derivati 6-alcil 1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-onici 14a,b

Una soluzione di 1-(2-fenilettil-2-idrossi)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **13** (2.88 g, 10 mmol) e dell'appropriato ioduro alchilico (50 mmol) in THF anidro (20 mL) viene refluita per 12 h. Il solvente e l'eccesso di ioduro alchilico sono rimossi mediante distillazione a pressione ridotta. Per il composto **14a** si ottiene un olio che viene cristallizzato aggiungendo CHCl<sub>3</sub> (10 mL) e quindi purificato mediante ricristallizzazione da etanolo assoluto. Per quanto riguarda il composto **14b**, il grezzo viene purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice (100 mesh) usando come eluente una miscela di CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1). Si ottiene il composto **14b** puro come solido giallo chiaro.

### 1-(2-Fenilettil-2-idrossi)-6-(metiltio)-1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one 14a

P.f.: 208-209 °C

Resa: 72%

Analisi elementare per C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

P.M. 302.35

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	55.61	4.67	18.53	10.61
<b>Trovato</b>	55.46	4.34	18.71	10.58

IR (cm<sup>-1</sup>): 3544 (NH), 3450-3100 (OH), 1678 (CO).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>S), 4.27-4.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.04-5.18 (m, 1H, CHO), 5.68 (d, 1H, OH, scompare con D<sub>2</sub>O), 7.20-7.42 (m, 5H Ar), 7.97 (s, 1H, H-3).

**6-(Etiltio)-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1,5-diidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-one 14b**

P.f.: 199-200 °C

Resa: 65%

Analisi elementare per C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

P.M. 316.38

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	56.95	5.10	17.71	10.13
<b>Trovato</b>	56.75	5.05	17.53	10.58

IR (cm<sup>-1</sup>): 3470 (NH), 3450-3140 (OH), 1670 (CO).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 1.45 (t, *J* = 7.4, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.22 (q, *J* = 7.4, 2H, CH<sub>2</sub>S), 4.44-4.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.21-5.30 (m, 1H, CHO), 7.26-7.47 (m, 5H Ar), 8.10 (s, 1H, H-3).

## Preparazione dell' 1-(2-fenilettil-2-idrossi)-6-(isopropiltio)-1,5-diidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one 14c

Una miscela di 1-(2-idrossi-2-fenilettil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **13** (2.88 g, 10 mmol), 2-bromopropano (1.25 g, 10.14 mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro (1.38 g, 10 mmol) in DMF anidra (10 ml) viene agitata a temperatura ambiente per 8 h. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la miscela è versata in H<sub>2</sub>O fredda. Si ottiene un solido che viene filtrato, lavato con H<sub>2</sub>O e ricristallizzato da etanolo assoluto.

P.f.: 194-195 °C

Resa: 37%

Analisi elementare per C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

P.M. 330.41

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	58.16	5.49	16.96	9.71
<b>Trovato</b>	57.95	5.59	17.12	9.81

IR (cm<sup>-1</sup>): 3300-3100 (NH+OH), 1704 (CO).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.44 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 3.90 (d, 1H, OH, scompare con D<sub>2</sub>O), 3.98 (set, *J* = 6.2 Hz, 1H, CHS), 4.38-4.48 e 4.50-4.58 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.19-5.22 (m, 1H, CHO), 7.24-7.37 (m, 5H Ar), 8.06 (s, 1H, H-3), 11.06 (s all., 1H, NH scompare con D<sub>2</sub>O).

## Preparazione generale dei derivati 6 alchil 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)- 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidinici 15a-c

Il complesso di Vilsmeier, preparato da POCl<sub>3</sub> (6.13g, 40 mmol) e DMF anidra (2.92 g, 40 mmol), viene aggiunto a una sospensione dell'opportuno derivato 6-alchil 1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1,5-diidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-onico **14a-c** (10 mmol per ottenere **15a,b**, e 40 mmol per ottenere **15c**) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). La miscela viene refluita per 4-8 h.

Dopo raffreddamento, si riprende cautamente con H<sub>2</sub>O (50 mL) e si estrae due volte con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL); le fasi organiche riunite vengono lavate con H<sub>2</sub>O (50 mL), seccate su MgSO<sub>4</sub> ed evaporate a pressione ridotta.

Si ottiene un olio grezzo che viene purificato tramite colonna cromatografica su gel di silice (100 mesh) usando come eluente dietilere o una miscela di dietilere/petroliere (p.e. 40-60 °C) (1:1).

Si ottiene un olio puro che cristallizza aggiungendo petroliere (p.e. 40-60 °C).

### 4-Cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(metiltio)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina 15a

P.f.: 95-96 °C

Resa: 65%

Analisi elementare per C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>S

P.M. 339.24

	C%	H%	N%	S%
<b>Calcolato</b>	49.57	3.57	16.52	9.45
<b>Trovato</b>	49.72	3.37	16.80	9.36

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>S), 4.77-5.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.45-5.56 (m, 1H, CHCl), 7.29-7.46 (m, 5H Ar), 8.02 (s, 1H, H-3).

**4-Cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(etiltio)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina 15b**

P.f.: 89-90 °C

Resa: 60%

Analisi elementare per C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>S

P.M 353.27

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	51.00	3.99	15.86	9.08
<b>Trovato</b>	51.15	3.81	15.96	9.24

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.49 (t, *J* = 7.2, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.23 (q, *J* = 7.2, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.75-5.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.43-5.57 (m, 1H, CHCl), 7.28-7.47 (m, 5H Ar), 8.04 (s, 1H, H-3).

**4-Cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(isopropiltio)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina 15c**

P.f.: 67-68 °C

Resa: 74%

Analisi elementare per C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>S

P.M. 367.30

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	52.32	4.39	15.25	8.73
<b>Trovato</b>	52.13	4.53	15.39	8.84

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.45 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.49 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.00 (set, *J* = 6.2 Hz, 1H, CHS), 4.74-4.82 e 4.88-4.97 (2m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.45-5.55 (m, 1H, CHCl), 7.21-7.50 (m, 5H Ar), 8.00 (s, 1H, H-3).

## Preparazione generale dei derivati 6-alcil 1-(2-cloro-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici 4-anilino sostituiti 9a-d

Ad una sospensione di derivato 6-alcil 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinico **15a-c** (3.67 g, 10 mmoli) in etanolo assoluto (5 ml) si aggiunge l'opportuna anilina (20 mmoli). Quindi si scalda a riflusso per 3-5 h; dopo raffreddamento precipitano solidi bianchi che vengono filtrati, lavati con acqua e ricristallizzati da etanolo assoluto.

### *N*-(2-Clorofenil)-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(metiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina **9a**

P.f.: 169-170 °C

Resa: 69%

Analisi elementare per C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>S

P.M. 430.35

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	55.82	3.98	16.27	7.45
<b>Trovato</b>	55.78	4.11	16.45	7.06

IR (cm<sup>-1</sup>): 3156 (NH).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.44 (s, 3H, CH<sub>3</sub>S), 4.63-5.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.58-5.68 (m, 1H, CHCl), 7.39-7.66 (m, 9H Ar), 10.11 (s, 1H, H-3).

***N*-(4-Clorofenil)-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(metiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 9b**

P.f.: 123-130 °C (dec).

Resa: 57%

Analisi elementare per C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>S

P.M. 430.35

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	55.82	3.98	16.27	7.45
<b>Trovato</b>	55.99	4.09	16.45	7.05

IR (cm<sup>-1</sup>): 3361 (NH).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.67 (s, 3H, CH<sub>3</sub>S), 4.61-4.70 e 4.72-4.82 (2m, 3H, CH<sub>2</sub>CHCl), 6.36 (d, *J* = 8.4, 2H Ar in orto a NH), 6.98 (d, *J* = 8.4, 2H Ar in meta a NH), 7.33-7.48 (m, 6H, 5Ar + H-3).

***1*-(2-Cloro-2-fenilettil)-6-(etiltio)-*N*-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 9c**

P.f.: 128-131 °C

Resa: 51%

Analisi elementare per C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>ClS

P.M. 409.93

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	61.53	4.92	17.08	7.82
<b>Trovato</b>	61.31	4.66	17.23	8.02

IR (cm<sup>-1</sup>): 3357 (NH).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.50 (t, *J* = 7.4, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.27 (q, *J* = 7.4, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.63-4.86 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 5.40-5.57 (m, 1H, CHCl), 7.29-7.50 (m, 11H, 10 Ar + H-3).

***N*-(3-Clorofenil)-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(isopropiltio)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 9d**

P.f.: 208-214 °C

Resa: 65%

Analisi elementare per C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>S

P.M. 458.41

	<b>C%</b>	<b>H%</b>	<b>N%</b>	<b>S%</b>
<b>Calcolato</b>	57.64	4.62	15.28	7.00
<b>Trovato</b>	57.64	4.88	15.28	6.79

IR (cm<sup>-1</sup>): 2935 (NH).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.23 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.99 (set, *J* = 7.0 Hz, 1H, CHS), 5.00-5.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 6.07-6.13 (m, 1H, CHCl), 7.13-7.52 (m, 8H Ar), 8.08-8.09 (m, 1H Ar in orto a NH) 8.60 (s, 1H, H-3).

## BIBLIOGRAFIA

1. Roskoski R Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 94:9-25. **2015**
2. Manning G, Whyte D B, Sudarsanam S *et al.* The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (5600), 1912-1934. **2002**
3. Gocek E, Moulas A N, Studzinski G P. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit Rev Clin Lab Sci* 51(3), 125-137. **2014**
4. Hojjat-Farsangi M. Targeting non-receptor tyrosine kinases using small molecule inhibitors: an overview of recent advances. *J Drug Target* 24(3), 192-211. **2016**
5. Du J, Bernasconi P, Hieronymus H *et al.* Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies Src as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat Biotechnol* 27 (1), 77-83. **2009**
6. Chong Y P, Mulhern T D, Cheng H C. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK homologous kinase (CHK)-endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors* 23 (3), 233-244. **2005**
7. Abram C L, Courtneidge S A. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254 (1), 1-13. **2000**
8. Playford M P, Schaller M D. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23 (48), 7928-7946. **2004**
9. Mitra S K, Schlaepfer D D. Integrin-regulated Fak-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18 (5), 516-523. **2006**
10. Cartwright C A, Kamps M P, Eckhart W *et al.* Pp60c-Src activation in human colon carcinoma. *J Clin Invest* 83 (6), 2025-2033. **1989**
11. Egan C, Pang A, Fujita D J *et al.* Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530. *Oncogene* 18 (5), 1227-1237. **1999**

12. Zhang J, Kalyankrishna S, Kurie J M *et al.* Src-family kinases are activated in non-small cell lung cancer and promote the survival of epidermal growth factor receptor-dependent cell lines. *Am J Pathol* 170 (1), 366-376. **2007**
13. Zhao R, Wu Y, Jin X *et al.* Elevated Src expression associated with hepatocellular carcinoma metastasis in northern chinese patients. *Oncol Lett* 10 (5), 3026-3034. **2015**
14. Varkaris A, Katsiampoura A D, Corn P G *et al.* Src signaling pathways in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 33 (2-3), 595-606. **2014**
15. Hilbig A. Src kinase and pancreatic cancer. *Recent Results Cancer Res* 177, 179-185. **2008**
16. Ahluwalia M S, De Groot J, Gladson C L *et al.* Targeting Src in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. *Cancer Lett* 298, 139-149. **2010**
17. Yang X M, Walter G. Specific kinase activity and phosphorylation state of Pp60c-Src from neuroblastomas and fibroblasts. *Oncogene* 3 (3), 237-244. **1988**
18. Pene-Dumitrescu T, Smithgall T E. Expression of a Src family kinase in chronic myelogenous leukemia cells induces resistance to imatinib in a kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 285 (28), 21446-21457. **2010**
19. Ke J, Chelvarajan R L, Bondada S *et al.* Anomalous constitutive Src kinase activity promotes B lymphoma survival and growth. *Mol Cancer* 8, 132. **2009**
20. Riley D, Carragher N O, Wyke J A *et al.* The mechanism of cell cycle regulation by v-Src. *Oncogene* 20 (42), 5941-5950. **2001**
21. Laplante P, Raymond M A, Hébert M J *et al.* Perlecan proteolysis induces an A2 $\beta$ 1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem* 281 (41), 30383-30392. **2006**
22. Fincham V J, Frame M C. The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J* 17 (1), 81-92. **1998**
23. Johansson M W, Larsson E, Ruoslahti E *et al.* Altered localization and cytoplasmic domain-binding properties of tyrosine-phosphorylated beta 1 integrin. *J Cell Biol* 126 (5), 1299-1309. **1994**

24. Lin B R, Chang C C, Chen L R *et al.* Cysteine-rich 61 (CCN1) enhances chemotactic migration, 106 transendothelial cell migration, and intravasation by concomitantly up-regulating chemokine receptor 1 and 2. *Mol Cancer Res* 5 (11), 1111-1123. **2007**
25. Leupold J H, Asangani I, Allgayer H *et al.* Src induces urokinase receptor gene expression and invasion/intravasation via activator protein-1/p-cJun in colorectal cancer. *Mol Cancer Res* 5 (5), 485-496. **2007**
26. Summy J M, Trevino J G, Sawyer T K *et al.* AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes. *Mol Cancer Ther* 4 (12), 1900-1911. **2005**
27. Kypta R M, Hemming A, Courtneidge S A. Identification and characterization of p59fyn (a src-like protein tyrosine kinase) in normal and polyoma virus transformed cells. *EMBO J* 7, 3837-3844. **1988**
28. Saito Y D, Jensen A R, Posadas E M *et al.* Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer* 116, 1629-1637. **2010**
29. Cooke M P, Abraham K M, Perlmutter R M *et al.* Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase (p59fyn). *Cell* 65, 281-291. **1991**
30. Sperber B R, McMorris F A. Fyn tyrosine kinase regulates oligodendroglial cell development but is not required for morphological differentiation of oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 63, 303-312. **2001**
31. Palacios E H, Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23, 7990-8000. **2004**
32. Kawakami T, Kawakami Y, Robbins K C *et al.* Acquisition of transforming properties by Fyn, a normal Src-related human gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85, 3870-3874. **1988**
33. Schenone S, Musumeci F, Botta M *et al.* Fyn kinase in brain diseases and cancer: the search for inhibitors. *Curr Med Chem* 18, 2921-2942. **2011**
34. Thomas S M, Brugge J S. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609. **1997**

35. Schenone S, Manetti F, Botta M. Synthetic Src-kinase domain inhibitors and their structural requirements. *Anticancer Agents Med Chem* 7, 660-680. **2007**
36. Hanks S K, Quinn A M, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52. **1988**
37. Zur Hausen J D, Burn P, Amrein K E. Co-localization of Fyn with CD3 complex, CD45 or CD28 depends on different mechanisms. *Eur J Immunol* 27, 2643-2649. **1997**
38. Salmond R J, Filby A, Zamoyska R *et al.* T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 228, 9-22. **2009**
39. Kojima N, Wang J, Kandel E R *et al.* Rescuing impairment of long-term potentiation in Fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94, 4761-4765. **1997**
40. Grant S G, O'Dell T J, Kandel E R *et al.* Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in Fyn mutant mice. *Science* 258, 1903-1910. **1992**
41. Osterhout D J, Wolven A, Chao M V *et al.* Morphological differentiation of oligodendrocytes requires activation of Fyn tyrosine kinase. *J Cell Biol* 145, 1209-1218. **1999**
42. Belkadi A, LoPresti P. Truncated Tau with the Fyn-binding domain and without the microtubule-binding domain hinders the myelinating capacity of an oligodendrocyte cell line. *J Neurochem* 107, 351-360. **2008**
43. Lee G, Thangavel R, Ksiezak-Reding H *et al.* Phosphorylation of Tau by Fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2304-2312. **2004**
44. Lee V M, Goedert M, Trojanowski J Q. Neurodegenerative tauopathies. *Ann Rev Neurosci* 24, 1121-1159. **2001**
45. Bhaskar K, Yen S H, Lee G. Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and Tau. *J Biol Chem* 280, 35119-35125. **2005**
46. Lee G. Tau and Src family kinases. *Biochim Biophys Acta* 1739, 323-330. **2005**
47. Lambert M P, Barlow A K, Klein W L *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95, 6448-6453. **1998**

48. Chin J, Palop J J, Mucke L *et al.* Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci* 25, 9694-9703. **2005**
49. Yeatman T J. A renaissance for Src. *Nat Rev Cancer* 4, 470-480. **2004**
50. Baillat G, Siret C, Luis J *et al.* Early adhesion induces interaction of Fak and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1783, 2323-2331. **2008**
51. Fresno Vara J A, Cáceres M A, Martín-Pérez J *et al.* Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell* 12, 2171-2183. **2001**
52. Yasunaga M, Yagi T, Nishikawa S *et al.* Involvement of Fyn tyrosine kinase in progression of cytokinesis of B lymphocyte progenitor. *J Cell Biol* 132, 91-99. **1996**
53. Paszek M J, Zahir N, Weaver V M *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254. **2005**
54. Kostic A, Sheetz M P. Fibronectin rigidity response through Fyn and p130Cas recruitment to the leading edge. *Mol Biol Cell* 17, 2684-2695. **2006**
55. Martin F T, Dwyer R M, Kerin M J *et al.* Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumor microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast Cancer Res Treat* 124, 317-326. **2010**
56. Reissig D, Clement J, Böhmer F D. *et al.* Elevated activity and expression of Src-family kinases in human breast carcinoma tissue versus matched non-tumor tissue. *J Cancer Res Clin Oncol* 127, 226-230. **2001**
57. Posadas E M, Al-Ahmadie H, Salgia R *et al.* Fyn is overexpressed in human prostate cancer. *BJU Int* 103, 171-177. **2009**
58. Huang J, Asawa T, Sakai R *et al.* Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma. *J Biol Chem* 278, 48367-48376. **2003**
59. Li X, Yang Y, Ramos D M *et al.*  $\alpha_v\beta_6$ -Fyn signaling promotes oral cancer progression. *J Biol Chem* 278, 41646-41653. **2003**
60. Wu X, Rauch T A, Pfeifer G P *et al.* CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res* 70, 2718-2727. **2010**

61. Lu K V, Zhu S, Mischel P S *et al.* Fyn and Src are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer Res* 69, 6889-6898. **2009**
62. Chen Z Y, Cai L, Li X W *et al.* Roles of Fyn in pancreatic cancer metastasis. *J Gastroenterol Hepatol* 25, 293-301. **2010**
63. Menges C W, Chen Y, Testa J R *et al.* A phosphotyrosine proteomic screen identifies multiple tyrosine kinase signaling pathways aberrantly activated in malignant mesothelioma. *Genes Cancer* 1, 493-505. **2010**
64. Ban K, Gao Y, Chandra J *et al.* Bcr-Abl1 mediates up-regulation of Fyn in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 111, 2904-2908. **2008**
65. Juric D, Lacayo N J, Sikic B I *et al.* Differential gene expression patterns and interaction networks in Bcr-Abl-positive and-negative adult acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Oncol* 25, 1341-1349. **2007**
66. Dhut S, Chaplin T, Young BD. Bcr-Abl and Bcr proteins: biochemical characterization and localization. *Leukemia* 4, 745-750. **1990**
67. Salesse S, Verfaillie C M. Bcr-Abl: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 21 (56), 8547-8559. **2002**
68. Sawyers C L. Signal transduction pathways involved in Bcr-Abl transformation. *Baillieres Clin Haematol* 10 (2), 223-231. **1997**
69. Nagar B, Hantschel O, Young M A *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859-871. **2003**.
70. Liu Y, Gray N S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol* 2, 358-364. **2006**
71. Zuccotto F, Ardini E, Angiolini M. *et al.* Through the 'gatekeeper door': exploiting the active kinase. *J Med Chem* 53, 2681-2694. **2010**
72. Nagar B, Hantschel O, Young MA *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859-871. **2003**
73. Boggon T J, Eck M J. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927. **2004**

74. Schenone S, Brullo C, Botta M. New opportunities to treat the T315I-Bcr-Abl mutant in chronic myeloid leukaemia: tyrosine kinase inhibitors and molecules that act by alternative mechanisms. *Curr Med Chem* 17, 1220-1245. **2010**.
75. Yaish P, Gazit A, Levitzki A *et al*. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 242 (4880), 933-935. **1988**
76. Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res* 152, 104609. **2020**
77. Hu Y, Liu Y, Pelletier S *et al*. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for Bcr-Abl1 induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 36, 453-461. **2004**
78. Li J, Xu G, Guo L *et al*. Dasatinib treatment for imatinib resistant or intolerant patients with chronic myeloid leukaemia. *J Int Med Res* 39, 337-347. **2011**
79. Hanke J H, Gardner J P, Dow R L *et al*. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271, 695-701. **1996**
80. Tatton L, Morley G M, Khwaja A *et al*. The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278, 4847-4853. **2003**
81. Sokal J E, Baccarani M, Tura S *et al*. Staging and prognosis in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 25, 49-61. **1988**
82. Kantarjian H, Shah N P, Hochhaus A *et al*. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362, 2260-2270. **2010**
83. Cortes J E, Jones D, O'Brien S *et al*. Results of dasatinib therapy in patients with early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28, 398-404. **2009**
84. Porkka K, Koskenvesa P, Lundán T *et al*. Dasatinib crosses the blood–brain barrier and is an efficient therapy for central nervous system Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Blood* 112, 1005-1012. **2008**
85. Pichot C S, Hartig S M, Xia L *et al*. Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. *Br J Cancer* 101, 38-47. **2009**

86. Miller A A, Pang H, Hodgson L *et al.* A Phase II study of dasatinib in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer (CALGB 30602). *J Thorac Oncol* 5, 380-384. **2010**
87. Johnson F M, Bekele B N, Feng L *et al.* Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28, 4609-4615. **2010**
88. Nautiyal J, Banerjee S, Kanwar S S *et al.* Curcumin enhances dasatinib-induced inhibition of growth and transformation of colon cancer cells. *Int J Cancer* 128, 951-961. **2011**
89. Morton J P, Karim S A, Graham K *et al.* Dasatinib inhibits the development of metastases in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* 139, 292-303. **2010**
90. Musumeci F, Schenone S, Botta M *et al.* An update on dual Src/Abl inhibitors. *Future Med Chem* 4 (6), 799-822. **2012**
91. Boschelli D H, Ye F, Wang Y D *et al.* Optimization of 4-phenylamino-3-quinoline carbonitriles as potent inhibitors of Src kinase activity. *J Med Chem* 44, 3965-3977. **2001**
92. Study of bosutinib with capecitabine in solid tumors and locally advanced or metastatic breast cancer - Full text view - *ClinicalTrials.gov* (ultimo accesso 25 ottobre **2019**)
93. Taylor J W, Dietrich J, Giorgio D H *et al.* Phase 2 Study of bosutinib, a Src inhibitor, in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 121 (3), 557-563. **2015**
94. Messersmith W A, Krishnamurthi S, Hewes B A *et al.* Bosutinib (SKI-606), a dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitor: preliminary results from a phase 1 study in patients with advanced malignant solid tumors. *J Clin Oncol 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings* 25(18S), 3552. **2007**
95. Golas J M, Arndt K, Etienne C *et al.* SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res* 63, 375-381. **2003**
96. Puttini M, Coluccia A M, Boschelli F *et al.* In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res* 66, 11314-11322. **2006**

97. Gambacorti-Passerini C, Kim D W, Kantarjian H M *et al.* An ongoing phase 3 study of bosutinib (SKI-606) versus imatinib in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 116, (Abstract 208). **2010**
98. Hebbard L, Cecena G, Golas J *et al.* Control of mammary tumor differentiation by SKI-606 (bosutinib). *Oncogene* 30, 301-312. **2011**
99. Rabbani S A, Valentino M L, Boschelli F *et al.* SKI-606 (bosutinib) blocks prostate cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo through regulation of genes involved in cancer growth and skeletal metastasis. *Mol Cancer Ther* 9, 1147-1157. **2010**
100. Rothschild S I, Gautschi O, Johnson F M. *et al.* Src inhibitors in lung cancer: current status and future directions. *Clin Lung Cancer* 11, 238-242. **2010**
101. Yasmeeen A, Alachkar A, Al Moustafa A E *et al.* Locking Src/Abl tyrosine kinase activities regulate cell differentiation and invasion of human cervical cancer cells expressing E6/E7 oncoproteins of high-risk HPV. *J. Oncol.* **2010**
102. Green T P, Fennell M, Whittaker R *et al.* Preclinical anticancer activity of the potent, oral Src inhibitor AZD0530. *Mol Oncol* 3, 248-261. **2009**
103. Hiscox S, Jordan N J, Smith C *et al.* Dual targeting of Src and ER prevents acquired antihormone resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 115, 57-67. **2009**
104. Purnell P R, Mack P C, Tepper C G *et al.* The Src inhibitor AZD0530 blocks invasion and may act as a radiosensitizer in lung cancer cells. *J Thorac Oncol* 4, 448-454. **2009**
105. Hannon R A, Clack G, Rimmer M *et al.* Effects of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) on bone turnover in healthy men: a randomized, double-blind, placebocontrolled, multiple-ascending-dose phase I trial. *J Bone Miner Res* 25, 463-471. **2010**
106. Tabernero J, Cervantes A, Hoekman K *et al.* I study of AZD0530, an oral potent inhibitor of Src kinase: First demonstration of inhibition of Src activity in human cancers. *J Clin Oncol ASCO Annual Meeting Proceedings* 25 (18S), 3520. **2007**
107. De Vries T J, Mullender M G, van Duin M A *et al.* The Src inhibitor AZD0530 reversibly inhibits the formation and activity of human osteoclasts. *Mol Cancer Res* 7, 476-488. **2009**

108. Scheweppe R E, Kerege A A, Haugen B R *et al.* Inhibition of Src with AZD0530 reveals the Src-focal adhesion kinase complex as a novel therapeutic target in papillary and anaplastic thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2199-2203. **2009**
109. Fury M G, Baxi S, Shen R *et al.* Phase II study of saracatinib (AZD0530) for patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Anticancer Res* 31, 249-253. **2011**
110. O'Hare T, Shakespeare W C, Zhu X *et al.* AP24534, a pan-Bcr-Abl inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation based resistance. *Cancer Cell* 16, 401-412. **2009**
111. Schenone S, Brullo C, Botta M. Small molecules ATP-competitive inhibitors of FLT3: a chemical overview. *Curr Med Chem* 15, 3113-3132. **2008**
112. Gozgit J M, Wong M J, Wardwell S *et al.* Potent activity of Ponatinib (AP24534) in models of FLT3-driven acute myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Mol Cancer Ther* 10, 1028-1035. **2011**
113. Hamilton A, Helgason G V, Schemionek M *et al.* Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood* 119(6), 1501-1510. **2011**
114. Corbin A S, Agarwal A, Loriaux M *et al.* Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of Bcr-Abl activity. *J Clin Invest* 121, 396-409. **2011**
115. Hennequin L F, Stokes E S, Thomas A P *et al.* Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 45, 1300-1312. **2002**
116. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T *et al.* ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res* 62, 7284-7290. **2002**
117. Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70. **2000**
118. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77, 527-543. **1999**

119. Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676. **2003**
120. Wedge S R, Ogilvie D J, Dukes M *et al.* ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62, 4645-4655. **2002**
121. Tonra J R, Deevi D S, Corcoran E *et al.* Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12, 2197-2207. **2006**
122. McCarty M F, Wey J, Stoeltzing O *et al.* ZD6474 a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits orthotopic growth and angiogenesis of gastric cancer. *Mol Cancer Ther* 3, 1041-1048. **2004**
123. Conrad C, Ischenko I, Köhl G *et al.* Antiangiogenic and antitumor activity of a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor ZD6474 in a metastatic human pancreatic tumor model. *Anticancer Drugs* 18, 569-579. **2007**
124. Dreys J, Konerding M A, Wolloscheck T *et al.* The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, inhibits angiogenesis and affects microvascular architecture within an orthotopically implanted renal cell carcinoma. *Angiogenesis* 7, 347-354. **2004**
125. Wu W, Onn A, Isobe T *et al.* Targeted therapy of orthotopic human lung cancer by combined vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor signaling blockade. *Mol Cancer Ther* 6, 471-483. **2007**
126. Taguchi F, Koh Y, Koizumi F *et al.* Anticancer effects of ZD6474, a VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in gefitinib (“Iressa”)-sensitive and resistant xenograft models. *Cancer Sci.* 95 984-989. **2004**
127. Ciardiello F, Caputo R, Damiano V *et al.* Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 9, 1546-1556. **2003**

128. Troiani T, Lockerbie O, Morrow M *et al.* Sequence-dependent inhibition of human colon cancer cell growth and of prosurvival pathways by oxaliplatin in combination with ZD6474 (Zactima), an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. *Mol Cancer Ther* 5, 1883-1894. **2006**
129. Hoang T, Huang S M, Armstrong E A *et al.* Augmentation of radiation response with the VEGFR-tyrosine kinase inhibitor ZD6474. *Proc Am Assoc Cancer Res* 45, 955. **2004**
130. Williams K J, Telfer B A, Brave S *et al.* ZD6474, a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor signaling, combined with radiotherapy: schedule-dependent enhancement of antitumor activity. *Clin Cancer Res* 10, 8587-8593. **2004**
131. De Boer R, Humblet Y, Wolf J *et al.* An open-label study of vandetanib with pemetrexed in patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 20, 486-491. **2009**
132. Saunders M P, Wilson R, Peeters M *et al.* Vandetanib with FOLFIRI in patients with advanced colorectal adenocarcinoma: results from an openlabel, multicentre Phase I study. *Cancer Chemother Pharmacol* 64 (4), 665-672. **2009**
133. Michael M, Gibbs P, Smith R *et al.* Open-label phase I trial of vandetanib in combination with mFOLFOX6 in patients with advanced colorectal cancer. *Invest New Drugs* 27 (3), 253-261. **2008**
134. Heymach J V, Hanrahan E O, Mann H *et al.* Baseline VEGF as a potential predictive biomarker of vandetanib clinical benefit in patients with advanced NSCLC. *J Clin Oncol* 15 (10), 3600-3609. **2008**
135. Wells S A, Gosnell J E, Gagel R F *et al.* Vandetanib in metastatic hereditary medullary thyroid cancer: follow-up results of an open-label phase II trial. *J Clin Oncol* 30 (2), 134-141. **2007**
136. Morabito A, Piccirillo M C, Perrone F *et al.* Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions. *The Oncologist* 14, 378-439. **2009**

137. Hanke J H, Gardner J P, Dow R L *et al.* Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271, 695-701. **1996**
138. Tatton L, Morley G M, Khwaja A *et al.* The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases. *J Biol Chem* 278, 4847-4853. **2003**
139. Nam J S, Ino Y, Hirohashi S *et al.* Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 8 (7), 2430-2436. **2002**
140. Chen T, Pengetnze Y, Taylor C C. Src inhibition enhances paclitaxel cytotoxicity in ovarian cancer cells by caspase-9-independent activation of caspase-3. *Mol Cancer The* 4 (2), 217-224. **2005**
141. Kong L, Deng Z, Zhang Y *et al.* Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173. *Mol Cell Biochem* 348, 11-19. **2011**
142. Radi M, Musumeci F, Brullo C *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines active in vivo on the Bcr-Abl T315I mutant. *J Med Chem* 13, 5382-5394. **2013**
143. 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* 1, 347-361. **2015**
144. Manetti F, Santucci A, Spallarossa A, *et al.* Identification of a Novel Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine Able To Inhibit Cell Proliferation of a Human Osteogenic Sarcoma in Vitro and in a Xenograft Model in Mice. *J Med Chem* 50(23), 5579-5588. **2007**
145. Schenone S, Brullo C, Bruno O, *et al.* Synthesis, biological evaluation and docking studies of 4-amino substituted 1H-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines *J Med Chem* 43(12), 2665-2676. **2008**
146. Tintori C, Schenone S, Musumeci F, *et al.* Studies on the ATP Binding Site of Fyn Kinase for the Identification of New Inhibitors and Their Evaluation as Potential Agents against Tauopathies and Tumors. *J Med Chem* 58(11), 4590-4609. **2015**

147. Sanna M, Sicilia G, Alazzo A, *et al.* Water solubility enhancement of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivatives via miniaturized polymer-drug microarrays. *ACS Med Chem Lett* 9, 193-197. **2018**
148. Calandro P, Iovenitti G, Zamperini C, *et al.* Plasmin-binding tripeptide-decorated liposomes loading pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines for targeting hepatocellular carcinoma. *ACS Med Chem Lett* 9, 646-651. **2018**