

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

**Pirazolo-pirimidine 4-benzilammino sostituite come potenziali
inibitori di Src**

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Schenone

Candidata:

Angie Melissa Zhingre Vaca

Anno Accademico 2020-2021

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
<i>1.1 SFKs: struttura e regolazione.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2 Dasatinib</i>	<i>7</i>
<i>1.3 Saracatinib.....</i>	<i>11</i>
<i>1.4 Bosutinib.....</i>	<i>12</i>
<i>1.5 I nuovi inibitori di Src nei trial clinici.....</i>	<i>14</i>
2. PROGETTO	16
3. DISCUSSIONE.....	20
<i>3.1 Chimica.....</i>	<i>20</i>
4. CONCLUSIONI.....	22
5. PARTE SPERIMENTALE	23
<i>5.1 Chimica.....</i>	<i>23</i>
6. BIBLIOGRAFIA.....	33

1. INTRODUZIONE

Le tirosina-chinasi non recettoriali sono una vasta famiglia di enzimi citosolici. Una delle famiglie più studiate è la SFKs (Src family kinases) i cui membri sono importanti targets nella terapia antitumorale.^{1,2} Sono stati identificati 10 componenti di questa famiglia: Src, Blk, Fyn, Frk, Hck, Lck, Lyn, Yes e Yrk e Srms.³⁻⁵

Sebbene diversi studi abbiano dimostrato la presenza di una certa ridondanza funzionale tra le SFKs, ci sono numerose prove che dimostrano funzioni non sovrapposte. Tra i vari membri di questa famiglia Src, Fyn e Yes sono risultati maggiormente coinvolti nella formazione di tumori e metastasi.⁶ Inoltre, Src, Fyn, Yes e Frk sono ubiquitari, mentre gli altri membri sono espressi prevalentemente in cellule ematopoietiche. Nei tumori solidi è stata osservata un'aumentata espressione di questi enzimi, compresi quelli che sono normalmente nelle cellule ematopoietiche.^{7,8}

Sono stati osservati alti livelli proteici di Src, Frk, Blk, Hck e Yes in differenti tumori. Le SFKs interagiscono direttamente con varie tirosina-chinasi recettoriali, recettori accoppiati a proteine G, recettori steroidei, trasduttori di segnali e attivatori di trascrizione, portando a una vasta gamma di funzioni biologiche, a partire dalla sopravvivenza cellulare fino alla formazione di metastasi.⁹ L'importanza delle SFKs nella metastatizzazione è un'evidenza consolidata ed è stata associata a diversi meccanismi d'azione, tra cui la promozione della motilità delle cellule tumorali, la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e l'adattamento delle cellule tumorali nel microambiente secondario dei siti di metastasi.^{10,11}

La sovraespressione o l'iperattivazione di Src è stata associata alla formazione aberrante di invadopodi, strutture utilizzate dalle cellule cancerose per penetrare nel flusso sanguigno e fuoriuscire in siti periferici durante il processo metastatico.^{12,13}

Src è un target potenziale per il trattamento di tumori. Infatti, l'inibizione di Src contrasta alcuni meccanismi che portano al fenotipo delle cellule tumorali, tra cui la stimolazione dei fibroblasti associati a cancro (CAFs), angiogenesi e infiltrazioni immunitarie.^{14,15}

Sebbene Src sia espresso ubiquitariamente, il principale fenotipo associato ai topi Src^{-/-}, in cui l'enzima non è espresso, è l'osteopetrosi, una condizione causata dal mancato riassorbimento osseo e caratterizzata da una massa ossea abnorme.¹⁶ Questi dati hanno indicato Src come un target terapeutico per la prevenzione e il trattamento delle metastasi ossee.¹⁷

1.1 SFKs: struttura e regolazione

Le SFKs mostrano una notevole somiglianza strutturale. La sequenza maggiormente variabile tra gli enzimi della SFKs è rappresentata dal dominio unico che collega i domini SH3 e SH4,¹⁸ e il cui ruolo non è stato ancora completamente delucidato. Src, il primo membro identificato tra le SFKs, è una proteina di 60 kDa in grado di associarsi alla membrana plasmatica, perinucleare ed endosomiale attraverso una regione di ancoraggio N-terminale che comprende il dominio SH4, ricco di residui carichi positivamente.¹⁹ Durante la rimodellazione del citoscheletro e la migrazione cellulare, le SFKs sono coinvolte anche nella formazione di adesioni focali, un fenomeno che è regolato principalmente dal dominio SH2.²⁰ Studi recenti hanno riportato la presenza di Src anche nel compartimento nucleare, e questa localizzazione sembra essere rilevante nella progressione di alcuni tumori solidi.^{21,22} Mentre l'attività enzimatica di Src è localizzata nel dominio SH1 (dominio catalitico), i domini SH2 e SH3 attraverso interazioni intra-proteina e proteina-proteina possono controllare l'attività catalitica e il riconoscimento dei substrati (**Figura 1**). Infatti, l'interazione dei vari domini della proteina e la fosforilazione-defosforilazione di un residuo di tirosina nel dominio SH1 determina un equilibrio dinamico tra la forma di SFK chiusa-inattiva e quella aperta-attiva. L'attivazione di Src inizia con la defosforilazione della Tyr530 (numerazione di Src umano) seguita dal cambio

conformazionale che permette l'autofosforilazione della Tyr419 con attivazione totale del sito catalitico.²³

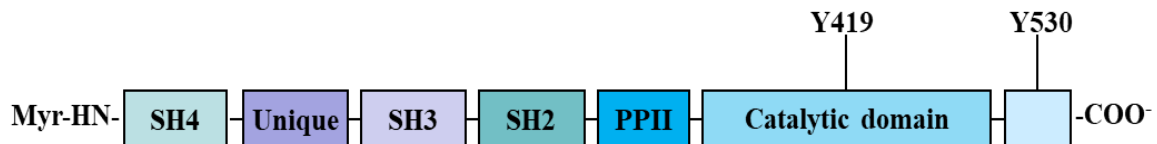


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura di Src. Sono riportati i residui di tirosina critici per l'attività delle chinasi.

In tutte le SFKs il principale controllo dell'attivazione catalitica è esercitato dallo stato di fosforilazione di un residuo tirosinico C-terminale (Tyr530 in Src umano). La fosforilazione di Tyr530 determina un cambiamento conformazionale che porta all'interazione intramolecolare con il dominio SH2 e inattiva l'attività della chinasi (**Figura 2**).²⁴

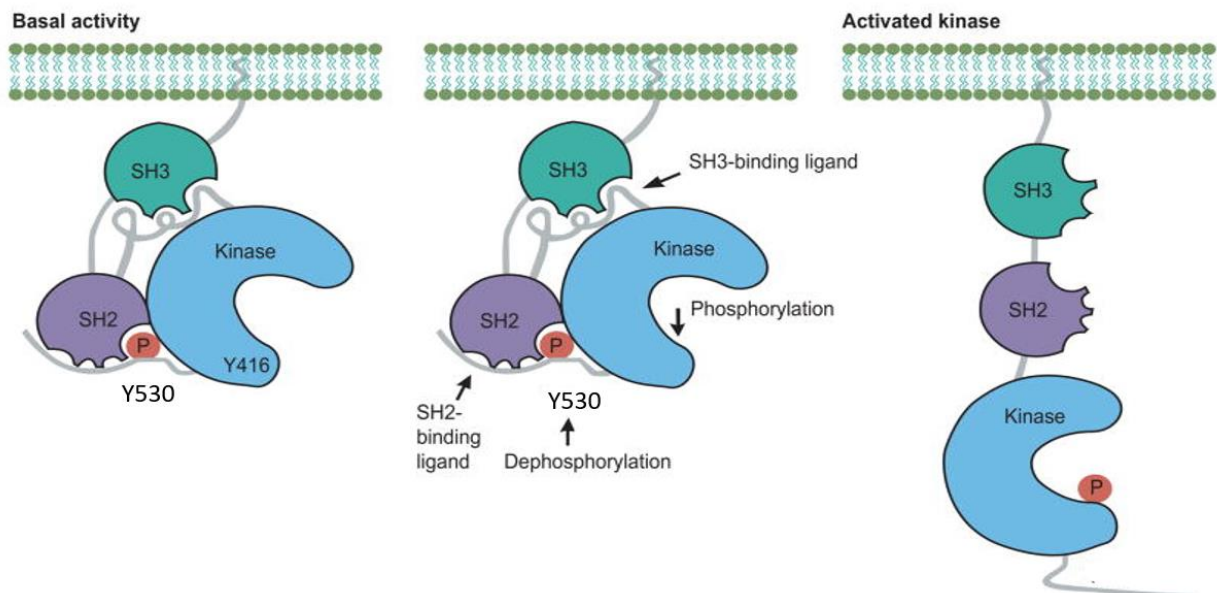


Figura 2. Struttura e attivazione di Src.

Src interagisce in modo diverso con altre proteine a seconda che si trovi nella conformazione spaziale attiva-aperta o in quella inattiva-chiusa.

Il dominio SH3, composto da 50-60 residui, lega sequenze ricche di prolina e può interagire con il dominio linker (PPII-linker) posto nella parte posteriore del dominio catalitico, così mantiene la conformazione chiusa che impedisce le interazioni con i substrati. Sono noti diversi ligandi che interferiscono con il legame tra SH3 e PPII: il recettore del progesterone, p130Cas, AFAP-110 e Nef. Il dominio SH2, formato da 100 residui aminoacidici, lega residui tirosinici fosforilati presenti nel dominio C-terminale nella conformazione inattiva.²⁵ Nel passaggio dalla forma aperta a quella chiusa avviene la fosforilazione della Tyr530 contemporaneamente con la defosforilazione della Tyr419, portando alla completa disattivazione della chinasi *in vivo*.

Comunque, il legame con ligandi esterni permette alle SFKs di aprire la loro conformazione spaziale e di restare attive anche in presenza della coda fosforilata (Tyr530) nella parte C-terminale. Ciò indica che la fosforilazione di residui di tirosina ad azione inibitoria e le conseguenti interazioni intramolecolari non sono sufficienti per mantenere l'attività di SFKs in uno stato di completa inibizione *in vivo*.²⁶

Alcune prove sperimentali suggeriscono che la fosfatasi CD45 può funzionare come regolatore negativo di SFK e agisce defosforilando la Tyr419 del sito catalitico.²⁷

Durante la progressione del tumore, l'attività di Src aumenta in modo anomalo e poiché le mutazioni attivanti o l'amplificazione sono piuttosto rare nella SFKs, un controllo alterato della fosforilazione da parte di chinasi o fosfatasi e delle proteine che interagiscono con Src può rappresentare un importante meccanismo per l'attivazione di Src stesso. La fosforilazione della Tyr530 è determinata dall'azione di differenti tirosin-chinasi, incluse Csk (chinasi Src C-terminale) e Chk (chinasi omologa alla Csk).²⁸ La chinasi Csk agisce come principale regolatore negativo di Src e in condizioni basali, *in vivo*, 90-95% di Src è fosforilata sulla Tyr530.

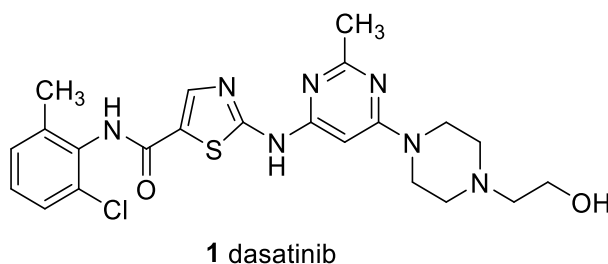
L'importanza della fosforilazione di Tyr530 nel meccanismo di inibizione dell'attività di Src è suggerita da diverse prove sperimentali.²⁹

Parecchi enzimi tirosina-fosfatasi (PTPs) sono coinvolti nel meccanismo di defosforilazione del residuo Tyr530 nella parte C terminale di Src. Il loro ruolo nella regolazione delle SFKs è complesso e specifico per alcuni tumori ed inoltre variabile per i vari membri di questa famiglia di chinasi. La fosfatasi PTP1B, che è sovraespressa in molti tumori solidi umani, tra cui cancro al colon, polmone e seno, è responsabile della defosforilazione di Tyr530 e della successiva attivazione di Src e perciò correlata con una maggiore aggressività del tumore. CD45, altamente espressa in tutte le cellule di origine ematopoietiche, è la principale fosfatasi che promuove la defosforilazione nella parte C terminale delle SFKs.³⁰ A differenza di Lck e Fyn, Src con il residuo Tyr530 fosforilato nel dominio C terminale non sembra soggetta a defosforilazione da parte di CD45.³¹ SHP-1 e SHP-2 sono 2 tirosina-fosfatasi localizzate nel citosol. SHP-1 è principalmente presente nelle cellule di origine ematopoietiche, mentre SHP-2 è ubiquitaria. Prove sperimentali hanno stabilito che SHP-1 è coinvolta nella defosforilazione e nell'attivazione di Src.³² SHP-1 e CD45 sono anche in grado di defosforilare la Tyr394 nel dominio catalitico di Lck, suggerendo che queste fosfatasi non sono coinvolte solo nell'attivazione di SFK ma anche nella modulazione della loro specificità.^{33,34} SHP-2 può regolare l'attività delle SFKs in diversi modi: tramite un meccanismo enzimatico che coinvolge la defosforilazione della parte C terminale, e un meccanismo non enzimatico collegato al controllo del reclutamento di Csk alla membrana plasmatica.³⁵

1.2 Dasatinib

Dasatinib è una molecola a basso peso molecolare, somministrabile per via orale, ed inibisce tra le altre chinasi anche Src. Questo composto ha ricevuto l'approvazione da parte dell'FDA e dell'EMA per la sua inibizione della tirosina chinasi BCR/ABL, codificata dal cromosoma

Philadelphia, ed è usato attualmente per trattare la leucemia mieloide cronica e la leucemia linfoblastica acuta Philadelphia positiva. Dasatinib non è molto selettivo e i suoi potenziali targets comprendono anche altre SFKs, tra cui Lck, Fyn e Yes, con IC₅₀ nel range basso nanomolare³⁶



I dati preclinici supportano l'ipotesi che la molecola possa essere attiva su tumori solidi, anche metastatici, e hanno suggerito il suo utilizzo nei trials clinici per i tumori solidi in stadio avanzato. Dal 2009 sono stati pubblicati numerosi risultati di studi di fase I/II condotti su diversi tipi di cancro e secondo protocolli molto diversi.

Tutti gli studi clinici hanno affrontato il profilo tossicologico del dasatinib, che comprende alcuni effetti secondari quali affaticamento, anoressia, nausea, diarrea, versamenti pleurico e pericardico, dispnea. Approssimativamente il 30% dei pazienti che ha iniziato il trattamento con il farmaco con una dose di 70 mg 2 volte al giorno ha richiesto una riduzione della dose a causa della sua tossicità. Sono state ottenute risposte parziali e stabilizzazione della malattia in molte situazioni, dove il dasatinib è stato usato in combinazione con altri farmaci e in sottopopolazioni di pazienti selezionati. Dasatinib, usato come monoterapia, ha un'attività limitata nel sottogruppo di pazienti con cancro metastatico. Nel carcinoma mammario avanzato, i risultati più promettenti sono stati riscontrati nelle pazienti responsivi agli ormoni (HR, Hormon Receptor). Nelle pazienti HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2) -

negative con metastasi ossee sono state osservate risposte parziali nel 23% dei casi, in combinazione con acido zoledronico.³⁷

In uno studio di fase 2, è stata valutata la sopravvivenza libera da progressione (PFS) della malattia in pazienti con carcinoma mammario avanzato positivo al recettore per gli estrogeni e trattate con un inibitore dell'aromatasi (examestano) in combinazione con dasatinib, in confronto con il trattamento con il solo examestano. Di 157 pazienti, 63 avevano una malattia ossea sintomatica. La PFS non è stata significativamente differente nei 2 gruppi, ma nel gruppo trattato con exemestano e dasatinib sono state ottenute risposte positive di 3 pazienti su 49, in confronto a 0 su 49 del gruppo trattato con il solo examestano, e si è osservata una stabilizzazione della malattia in 21 pazienti su 49 trattati con dasatinib e examestano, mentre con il solo examestano la stabilizzazione è stata osservata soltanto in 14 pazienti su 49. In pazienti con carcinoma mammario metastatico a predominanza ossea, dasatinib da solo non è riuscito a portare un beneficio significativo, considerando anche più metodi di valutazione, includendo PFS, monitoraggio degli antigeni MUC-1 e delle cellule tumorali circolanti.³⁸ Nelle donne con carcinoma mammario metastatico invasivo, refrattario alla terapia con i tassani e/o antracicline, è stata osservata una risposta parziale nel 35% dei tumori HR positivi e solo nel 6% di tumori HR negativi quando trattati con la combinazione dasatinib-capecitabina.³⁹ Recentemente è stato dimostrato che dasatinib può essere associato con trastuzumab e paclitaxel in pazienti con carcinoma mammario metastatico HER2 positivo (83% HR positivo), portando a risultati soddisfacenti.⁴⁰ In effetti, la combinazione di trastuzumab con dasatinib è stata testata in test preclinici, ed ha dimostrato un ruolo centrale di Src in modelli di cellule tumorali resistenti a trastuzumab.⁴¹

È stato condotto uno studio di fase III su 1522 pazienti affetti da cancro alla prostata con CRPC (malattia metastatica e fenotipo resistente alla castrazione) per confrontare dasatinib in combinazione con docetaxel (agente chemioterapico della classe dei tassani). Purtroppo,

dasatinib non è riuscito a migliorare la sopravvivenza totale o modificare in modo significativo la PFS mediana o il tempo mediano alla progressione del PSA (Prostate Specific Antigen).⁴²

D'altra parte, dasatinib da solo ha dimostrato un'attività farmacologica nelle lesioni ossee dei pazienti CRPC, con significativa riduzione dei marker di turnover osseo, associata con una malattia metastatica stabile dopo 3 mesi in una percentuale di pazienti superiore al 40%.^{43,44}

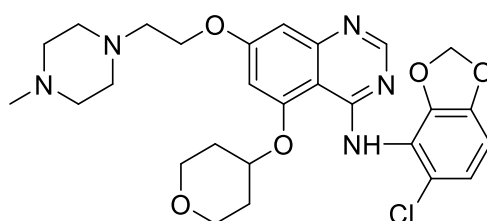
Sebbene siano stati riportati *in vitro* diversi parametri genetici predittivi della risposta a dasatinib, la convalidazione clinica di queste caratteristiche è stata improduttiva. Segni predittivi derivati da modelli sperimentali che coinvolgono le linee cellulari a disposizione confermano il loro ruolo limitato nella predittività clinica. Le analisi di Fak, paxillina e Src su biopsie di pazienti con cancro al seno metastatico non hanno portato a informazioni utili.⁴⁵ Di conseguenza non è stato possibile definire i tumori clinicamente sensibili a dasatinib usato come unico agente.⁴⁶

In pazienti con melanoma avanzato, un gruppo con le chinasi BRaf/NRas/Kit non mutate hanno mostrato una certa sensibilità al dasatinib in associazione dacarbazina.⁴⁷ Altri dati confermano una risposta parziale a dasatinib superiore nel melanoma Kit+ paragonato al melanoma Kit-. Tuttavia questi studi non sono riusciti a confermare un'attività migliore di dasatinib rispetto ad altri inibitori di Kit.^{48,49} Dasatinib mostra comunque attività clinica nei tumori Kit+, attribuibile probabilmente all'attività inibitoria di dasatinib verso la chinasi Kit, mentre in presenza di mutazioni di Kit il composto non è attivo.

Dasatinib ha mostrato attività in pazienti con NSCLC (cancro del polmone non a piccole cellule) con mutazioni di EGFR.⁵⁰

1.3 Saracatinib

Saracatinib (AZD0530), **2**, è una anilino-chinazolina altamente selettiva per le tirosina-chinasi non recettoriali biodisponibile per via orale. Inibisce varie chinasi, tra cui Src ($IC_{50} = 2.7$ nM), Yes ($IC_{50} = 4$ nM), Lck ($IC_{50} < 4$ nM) e Abl ($IC_{50} = 30$ nM).⁵¹



2 saracatinib

Gli effetti avversi di saracatinib a dosi di 175 mg giornaliere sono per la maggior parte facilmente gestibili. Saracatinib ha mostrato un'efficacia modesta in monoterapia come dimostrato nelle prove iniziali di fase I/II per il trattamento di vari tumori.⁵¹⁻⁵³

Saracatinib, usato come agente singolo, ha mostrato una risposta parziale in pazienti con NSCLC avanzato e trattato a lungo con cisplatino. In questa sperimentazione clinica è stato osservato anche un caso di significativa riduzione del tumore. Perciò è stato ipotizzato, tenendo conto anche i dati ricavati dagli studi su dasatinib, che ci potesse essere un sottogruppo di pazienti con NSCLC avanzato che può beneficiare dell'inibizione di Src.⁵⁴ Purtroppo anche in questo studio gli autori non sono stati in grado di individuare i marker predittivi, essendo scarsamente informativa l'analisi del livello di Src fosforilato.

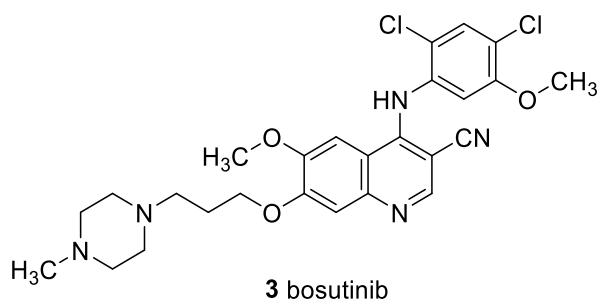
Uno studio progettato per valutare i marker di riassorbimento osseo nelle neoplasie avanzate, principalmente cancro al seno e al colon, ha indicato che saracatinib ha attività inibitoria sugli osteoclasti e ha suggerito il suo uso nella malattia ossea metastatica.⁵⁵ Questa evidenza non è stata osservata nei pazienti con CRPC dove la maggior parte dei casi ha mostrato una

progressione delle lesioni ossee nonostante il trattamento con il farmaco.⁵⁶ La combinazione con gemcitabina è risultata, come per dasatinib, ben tollerata ma non ha migliorato l'efficacia rispetto al trattamento con la sola gemcitabina.⁵⁷ Saracatinib è stato anche utilizzato in combinazione con paclitaxel, e l'efficacia maggiore è stata osservata in pazienti con carcinoma ovarico resistente al cisplatino, con un profilo di tossicità accettabile.⁵⁸ Tuttavia, dopo la sperimentazione clinica di fase III non si è potuto dimostrare una maggiore efficacia della combinazione di saracatinib con i tassani nel trattamento del carcinoma ovarico recidivante (resistente al cisplatino) rispetto al paclitaxel da solo.

Evidenze preliminari di attività antitumorale sono state osservate in pazienti con tumori solidi (principalmente cancro del colon-retto) avanzati già trattati a lungo con altri farmaci quando venivano trattati con saracatinib e cediranib, che è un inibitore del VEGF. Infatti, in più di un terzo dei pazienti si è notata una diminuzione della dimensione del tumore rispetto al controllo.⁵⁹ Al contrario, l'aggiunta di saracatinib a cediranib non ha migliorato l'efficacia nel carcinoma renale metastatico. In questo studio l'iperpressione di Fak è stato un indicatore della resistenza tumorale alla combinazione dei farmaci.⁶⁰ Saracatinib attualmente è in sperimentazione clinica per vari tipi di tumori.

1.4 Bosutinib

Bosutinib (SKI-606), **3**, è un inibitore di Src e di altre chinasi citoplasmatiche generalmente ben tollerato, con un profilo di sicurezza migliore rispetto a quello di dasatinib in una popolazione di pazienti simile, con effetti avversi prevalentemente gastrointestinali.⁶¹⁻⁶³



Il profilo di sicurezza è stato confermato anche nell'associazione con capecitabina per tumori solidi avanzati con malattia stabile, osservati in pazienti con cancro del colon-retto (9/14) e della mammella (5/11). Bosutinib ha dimostrato un'attività di inibizione più limitata verso Src/Abl rispetto a dasatinib. Uno studio di fase II in pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato o metastatico già trattati ha raggiunto malattia stabile (> 24 mesi) in più del 20% dei casi. Le pazienti appartenevano al sottogruppo con malattia positiva per l'HR. Questi risultati hanno spinto a progettare trials che utilizzino la combinazione con la terapia endocrina nei tumori al seno avanzati. Tuttavia, la combinazione con letrozolo o exemestano nella malattia HR+, sebbene bosutinib abbia dimostrato attività come agente singolo, ha determinato un profilo rischio-beneficio sfavorevole che ha condotto ad una conclusione anticipata degli studi.^{64,65} Diverse ricerche, nonostante il profilo di sicurezza di bosutinib, hanno dimostrato un'efficacia limitata in pazienti non selezionati anche in combinazione con altri farmaci e determinato in alcuni casi l'interruzione prematura dello studio.

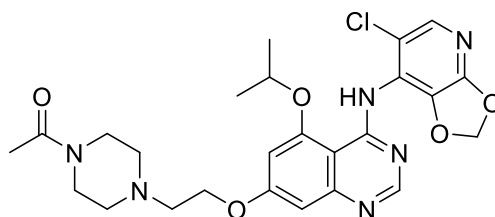
In uno studio successivo, l'associazione bosutinib con capecitabina ha determinato una malattia stabile di durata <24 settimane in pazienti con cancro al seno e cancro del colon-retto⁶⁶, e un altro studio di fase I/II sul cancro al seno con la stessa combinazione è stato interrotto prematuramente nel 2013 quando nella prima fase è stata osservata un'efficacia limitata.

Si è generalmente concluso che erano necessarie ulteriori analisi per definire meglio i biomarcatori predittivi per l'uso efficace del bosutinib. Sono attualmente attivi nuovi studi di

fase I: combinazione con pemetrexed in tumori solidi avanzati, (ClinicalTrials.gov: NCT03023319, reclutamento 2020); combinazione con palbociclib e fulvestrant per carcinoma mammario HR + Her2- avanzato refrattario ad altre terapie (ClinicalTrials.gov: NCT03854903, reclutamento 2020).

1.5 I nuovi inibitori di Src nei trial clinici

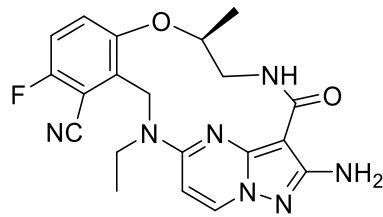
AZD0424, **4**, è un potente inibitore delle chinasi Src e Abl (IC_{50} circa 4 nM) disponibile per via orale, con attività aggiuntiva su Yes e Lck. Uno studio di fase I è stato condotto con AZD0424 in tumori solidi avanzati, in cui è stata dimostrata una evidente inibizione di Src a dosi ≥ 20 mg al giorno.



4 AZD0424

Tuttavia, i pazienti hanno manifestato più effetti avversi, anche gravi. AZD0424 non ha mostrato alcuna evidenza di efficacia come monoterapia.⁶⁷

Nuovi inibitori multi-chinasici con valori di IC_{50} bassi verso Src sono inibitori di chinasi coinvolte in percorsi di segnalazione specifici e potrebbero avere efficacia in popolazioni tumorali selezionate. TPX-0022, **5**, è un nuovo inibitore di Met/Csf1R/Src ($IC_{50} = 0.12$ nM per Src) ed è attualmente testato in uno studio di reclutamento di Fase I in pazienti con tumori solidi avanzati che mostrano alterazioni genetiche in Met (ClinicalTrials.gov: NCT03993873).

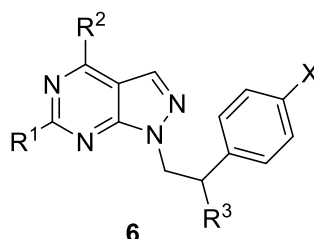


5 TPX-0022

TPX-0046 (struttura protetta da brevetto) è un inibitore doppio di Ret e Src. La concomitante inibizione di chinasi Src e Ret è stata ideata per contrastare la resistenza del bypass del segnale di una delle due chinasi e quindi potrebbe aumentare l'effetto terapeutico osservato con gli inibitori di Ret. È attualmente in fase di reclutamento uno studio di fase I/II su TPX-0046, in soggetti con tumori solidi avanzati che presentano fusioni o mutazioni di Ret, inclusi NSCLC e carcinoma midollare della tiroide (ClinicalTrials.gov: NCT04161391).

2. PROGETTO

Il gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale ha sintetizzato un'ampia libreria di 4-ammino-1-(2-cloro-2-feniletil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidine, **6**, attive come inibitori di Bcr-Abl e/o Src.⁶⁸⁻⁷⁰



R¹ = H, tioalchili

R² = gruppi amminici alifatici e aromatici

R³ = Cl, Br, OH

X = H, F, Cl, Br

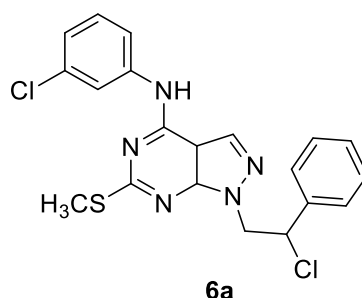
Come si evince dall'introduzione, Src è un enzima chiave per lo sviluppo e la progressione di molte neoplasie e la ricerca di nuove molecole inibitori di Src dotate di un buon profilo di attività e sicurezza è un campo molto fervente con grandi potenzialità per la terapia dei tumori. Infatti, gli inibitori di Src, non presentano gli effetti collaterali degli antitumorali classici e sono somministrabili per via orale. Questi vantaggi rendono la terapia meno impattante sulla qualità della vita del paziente e alleggeriscono il sistema sanitario.

Molti composti sintetizzati dal gruppo di ricerca sono risultati attivi in linee cellulari tumorali in cui l'attività di Src è alterata, come l'osteosarcoma e il neuroblastoma (NB).

L'osteosarcoma è il più frequente tumore maligno tra gli adolescenti e i giovani adulti e colpisce il sistema scheletrico: i precursori degli osteoblasti sono bloccati in una forma immatura e cancerosa senza riuscire a completare il differenziamento. Questo tumore è caratterizzato da un decorso clinico estremamente aggressivo, con rapida formazione di metastasi. Nonostante i

numerosi approcci farmaceutici (immunoterapia, terapia genica, ecc) la prognosi per questa patologia è ancora molto sfavorevole.⁷¹

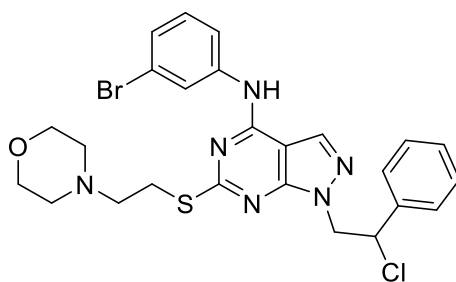
Il gruppo di ricerca ha identificato il composto in-house **6a** come potente agente antiproliferativo su cellule SaOS-2 (linea cellulare derivata da osteosarcoma primitivo). **6a** possiede un'IC₅₀ di 11.64 µM, paragonabile a quella del PP2, un potente inibitore di Src, usato come composto di riferimento (IC₅₀ = 8.07 µM).



Visti gli importanti risultati ottenuti, il composto **6a** è stato testato in un modello di osteosarcoma *in vivo*. Si è visto che la somministrazione orale di questo composto alla dose di 100 mg/Kg in topi xenografati con cellule SaOS-2 determina una significativa riduzione della massa tumorale (circa il 40%) rispetto al controllo dopo 26 giorni dall'inizio della sperimentazione.⁷¹

Anche per altri composti pirazolo-pirimidinici sintetizzati dal gruppo di ricerca è stata dimostrata un'attività antitumorale. Il neuroblastoma (NB) è un tumore maligno del sistema nervoso simpatico, è il più comune tumore solido extracranico e una delle principali cause di morte per neoplasia in età pediatrica. Infatti, nei pazienti inferiori a 15 anni, il NB rappresenta il 9% dei tumori maligni ed è la causa del 15% dei decessi in oncologia pediatrica.⁷²

In questo contesto, uno studio svolto da Schenone *et al.* ha permesso di identificare il derivato pirazolo[3,4-*d*]pirimidinico **6b** come promettente molecola per la terapia del neuroblastoma, in quanto è in grado di inibire la proliferazione cellulare in questo tipo di neoplasia.



6b

Il derivato **6b** ha una K_i di 130 nM in test enzimatici su Src e mostra una IC_{50} di 340 nM su cellule SHSY-5Y di NB.

Il composto è stato testato anche *in vivo* in topo xenotrapiantati con cellule SHSY-5Y di NB. La somministrazione orale di **6b** alla dose di 50 mg/Kg ha determinato dopo 60 giorni di trattamento una riduzione del volume tumorale superiore al 50% rispetto al controllo, con un effetto paragonabile a quello del dasatinib (**Figura 3**). Inoltre, non sono stati riscontrati negli animali segni di stress o perdita di peso.⁷²

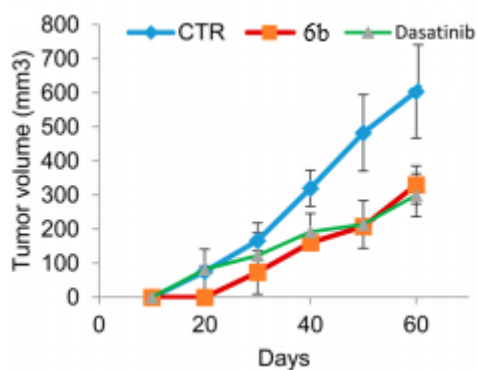
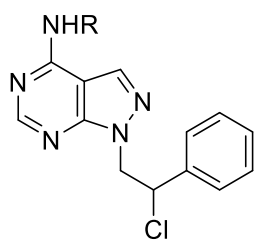


Figura 3. Valutazione dell'effetto antitumorale *in vivo* di **6b** e dasatinib (composto di riferimento) alla dose di 50 mg/Kg.

Sulla base di questi interessanti risultati ottenuti si è pensato di ampliare la serie di derivati pirazolo-pirimidinici 4-ammino sostituiti ed argomento della presente tesi sperimentale è la sintesi dei derivati **7a-c**.



7a-c

- 7a**, R = CH₂C₆H₄-2Br
7b, R = CH₂C₆H₄-4Br
7c, R = CH₂C₆H₃-2F-5F

Per la scelta delle molecole da sintetizzare, si è effettuato uno studio razionale finalizzato ad ampliare la conoscenza delle relazioni struttura-attività (SAR) all'interno di questa classe di composti, e ad ottenere molecole di seconda generazione più attive. In particolare, le molecole **7a-c** che ho sintetizzato presentano in N1 la catena 2-cloro-2-feniletolica, un sostituito benzilamminico sulla posizione C4 dell'anello pirimidinico, mentre non sono sostituite in C6. Si è pensato quindi di valutare l'effetto di vari alogeni sull'anello aromatico in C4. In dettaglio, i composti **7a e 7b** presentano in C4 la 2-bromobenzilammina e la 4-bromobenzilammina, rispettivamente, mentre il composto **7c** è decorato sull'anello benzenico in C4 con due atomi di fluoro.

3. DISCUSSIONE

3.1 *Chimica*

Per reazione dall'ossido di stirene con idrazina monoidrato si ottiene l'1-fenil-2-idrazinoetanolo **8**; il prodotto così ottenuto viene fatto reagire con etossimetilencianoacetato di etile in toluene anidro, portando alla formazione del 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **9**.

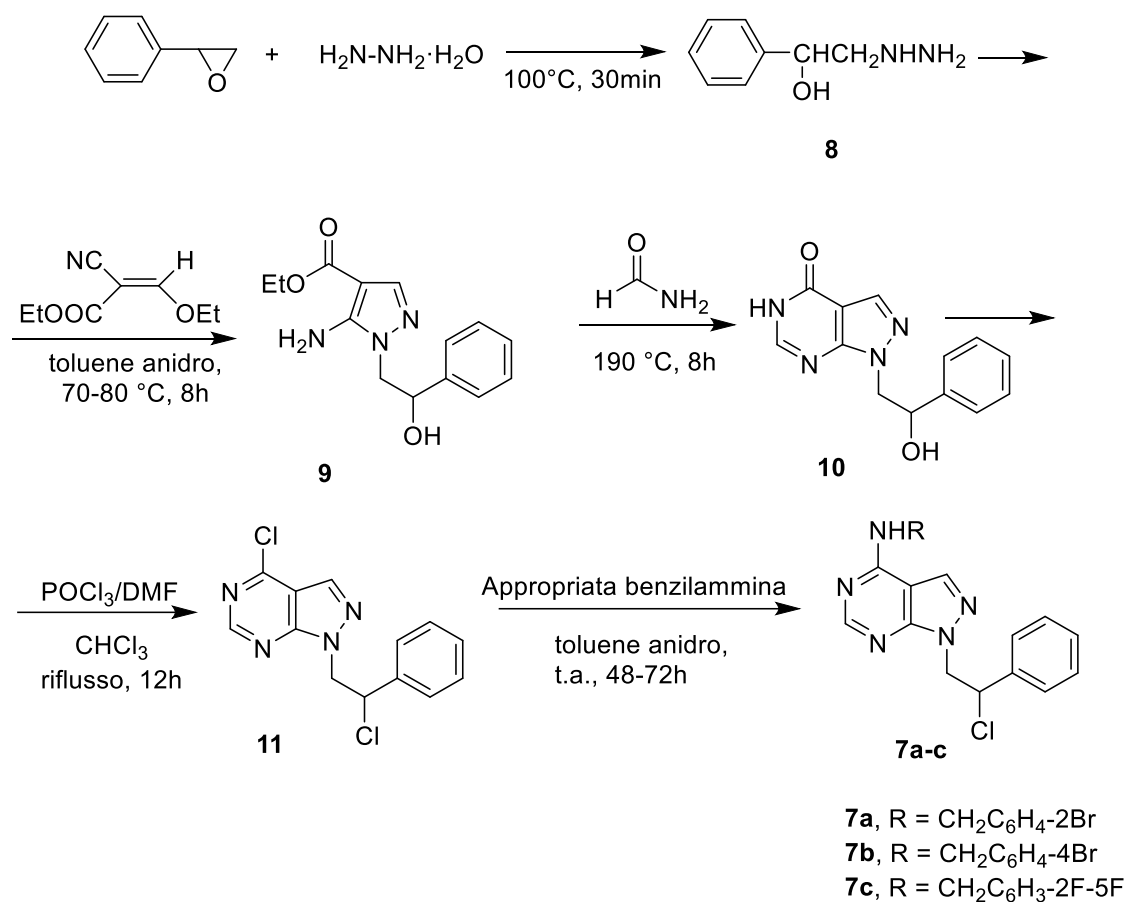
Il trattamento di questo ultimo con un eccesso di formammide a 190 °C per 8h porta alla formazione dell'intermedio 1-(2-fenilettil-2-idrossi)1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **10** con buona resa.

La successiva clorurazione con il complesso di Vilsmeier, preparato da ossicloruro di fosforo e dimetilformammide (DMF) anidra in quantità equimolecolari, porta al derivato 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinico **11** clorurato sia sulla catena dell'N1 pirazolico, sia sulla posizione 4 dell'anello pirimidinico.

Infine, la reazione dell'intermedio **11** con benzilammine opportunamente sostituite in toluene anidro a temperatura ambiente per 48-72h porta ai composti desiderati **7a-c** con buone rese.

(**Schema 1**).

Schema 1. Sintesi dei composti 6a-c



4. CONCLUSIONI

Questo lavoro ha portato all'ampliamento della libreria di composti a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica sintetizzata dal gruppo di ricerca in cui ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale. Per ottenere questi composti è stata utilizzata una strategia sintetica multistep che in cinque passaggi permette di ottenere i composti desiderati, introducendo la variabilità sull'anello in C4 a livello dell'ultimo step.

I composti verranno sottoposti a saggi *in vitro* per valutare la loro attività come inibitori di Src. Src è un enzima chiave nella formazione di molte neoplasie e la ricerca di nuove molecole inibitori di tale enzima con un buon profilo di attività e sicurezza rappresenta un campo con grandi potenzialità per la terapia dei tumori maligni. Infatti, gli inibitori chinasi non presentano gli effetti collaterali degli antitumorali classici e sono somministrabili per via orale. Sulla base dell'attività che mostreranno questi composti, si orienteranno le sintesi future al fine di ottenere inibitori di Src dotati di un'attività maggiore e un buon profilo farmacocinetico.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 *Chimica*

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

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

Gli spettri ¹H-NMR sono stati registrati con un apparecchio Varian Gemini 200 (200 MHz) oppure con un Bruker Avance DPX400 (400 MHz), oppure con un JEOL JNM ECZ-400S/L1 FT (400 MHz); i chemical shifts sono riportati in δ (ppm) usando come standard interno il tetrametilsilano (TMS); le *J* sono espresse in hertz (Hz). L'accoppiamento protonico è stato descritto usando le seguenti abbreviazioni: s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, m = multipletto, s all = s allargato. Gli spettri sono stati registrati in cloroformio deuterato (CDCl₃) o dimetilsolfossido deuterato (DMSO-d₆).

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

La purificazione per cromatografia è stata eseguita in colonna impaccata con gel di silice 60 Å, con particelle delle dimensioni di 220-440 mesh.

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

Sintesi dell'1-fenil-2-idrazinoetano 8

All'idrazina monoidrata (30 mL, 600 mmol) preriscaldata a 100 °C si aggiunge goccia a goccia l'ossido di stirene (20 mL, 170 mmol), mantenendo a riflusso per 30 minuti.

L'eccesso di idrazina si allontana a pressione ridotta. Il residuo ottenuto viene distillato con una pompa ad olio.

Resa: 82% (olio giallo)

P.e.: 155-158 °C/0.6 mmHg

PM: 152.20

Sintesi del 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **9**

Ad una soluzione di etossimetilencianoacetato di etile (3.38 g, 20 mmoli) in toluene anidro (20 mL) viene aggiunto 1-fenil-2-idrazinoetanolo **8** (3.04 g, 20 mmoli). La soluzione così ottenuta viene scaldata a 70-80 °C per 8h. Dopo raffreddamento si svapora il solvente a circa metà volume e si lascia cristallizzare.

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

P.f. 136-137 °C

Resa: 80%

Analisi elementare per C₁₄H₁₇N₃O₃

PM = 275.30

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

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

$^1\text{H-NMR}$: δ 1.33 (t, $J = 7.0$, 3H, CH_3), 3.53 (m, 1H, OH, scompare con D_2O), 3.92-4.20 (m, 2H, CH_2N), 4.25 (q, $J = 7.0$, 2H, CH_2O), 5.02-5.13 (m, 1H, CHOH), 5.30 (s all, 2H, NH_2 , scompare con D_2O), 7.23-7.42 (m, 5H Ar), 7.58 (s, 1H, H-3).

Sintesi del 1-(2-feniletil-2-idrossi)1,5-diidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one 10

Una sospensione del 5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **9** (8.53 g, 31 mmoli) in formammide (10 g, 33 mmoli) viene scaldata a 190 °C per 8h. Dopo raffreddamento, la miscela di reazione viene versata in acqua (300 mL). Il solido formatosi viene filtrato, lavato con acqua, sciolto in NaOH 2M e fatto bollire con carbone attivo per circa 10 minuti.

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

P.f. 270-271 °C (dec)

Resa: 70%

Analisi elementare per C₁₃H₁₂N₄O₂

PM = 256.26

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

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

$^1\text{H-NMR}$: δ 4.25-4.55 (m, 2H, CH_2), 5.05-5.15 (m, 1H, CHO), 5.65 (d, 1H, OH, scompare con D_2O), 7.25-7.45 (m, 5H Ar), 8.05 (s, 1H, H-3), 8.10 (s, 1H, H-6), 12.15 (s all, 1H, NH, scompare con D_2O).

Sintesi della 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina 11

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

P.f. 105-106 °C

Resa: 75%

Analisi elementare per C₁₃H₁₀N₄Cl₂

PM = 293.15

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

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

Procedura generale per la sintesi dei derivati 1-(2-cloro-2-feniletil)-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-amminici 7a-c

Ad una soluzione di 4-cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina **11** (0.29 g, 1 mmol) in toluene anidro (5 mL), viene aggiunta l'opportuna ammina (4 mmoli); la soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 48-72 h. La miscela di reazione viene lavata con H₂O (2 x 10 mL) e la fase toluenica viene seccata su MgSO₄, filtrata ed evaporata a pressione ridotta; l'olio residuo ottenuto cristallizza per aggiunta di una miscela di etere dietilico/ petroliere (p.e. 40-60 °C) (1:1) per dare i relativi prodotti 4-ammino sostituiti **7a-c**, purificati mediante ricristallizzazione da etanolo assoluto.

[1-(2-Cloro-2-feniletil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-il]-(2-bromo-benzil)-ammina **7a**

Resa: 42%

P.f. 182-184 °C

Analisi elementare per C₂₀H₁₇N₅ClBrH₂O

PM = 460.75

	C%	H%	N%
Calcolato	52.13	4.16	15.20
Trovato	52.72	4.33	15.27

IR (cm⁻¹): 3243 (NH).

^1H NMR: δ 4.55-4.66 e 4.78-4.87 (2m, 4H, CH_2N + CH_2Ar), 5.87-5.91 (m, 1H, CHCl), 7.04-7.51 (m, 9H Ar), 8.04 (s, 1H, H-3), 8.07 (s, 1H, H-6).

[1-(2-Cloro-2-feniletil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il]-(4-bromo-benzil)-ammina 7b

Resa: 39%

P.f. 148-149 °C

Analisi elementare per $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{ClBr}$

PM = 442.74

	C%	H%	N%
Calcolato	54.26	3.87	15.82
Trovato	54.26	4.26	15.71

IR (cm^{-1}): 3250 (NH).

^1H NMR: δ 4.55-4.66 e 4.78-4.87 (2m, 4H, CH_2N + CH_2Ar), 5.87-5.91 (m, 1H, CHCl), 7.04-7.51 (m, 9H Ar), 8.04 (s, 1H, H-3), 8.07 (s, 1H, H-6).

[1-(2-Cloro-2-feniletil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-il]-(2,5-difluoro-benzil)-ammina 7c

Resa: 37%

P.f. 172-174 °C

Analisi elementare per $C_{20}H_{16}N_5ClF_2$

PM = 399.82

	C%	H%	N%
Calcolato	60.08	4.03	17.52
Trovato	59.80	4.26	17.38

IR (cm^{-1}): 3286 (NH).

1H NMR: δ 4.37-4.40 e 4.63-4.74 (2m, 4H, CH_2N + CH_2Ar), 5.78-5.83 (m, 1H, $CHCl$), 7.02-7.65 (m, 8H Ar), 8.01 (s, 1H, H-3), 8.21 (s, 1H, H-6).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Martellucci, S.; Clementi, L.; Sabetta, S.; Mattei, V.; Botta, L.; Angelucci, A. Src family kinases as therapeutic targets in advanced solid tumors: what we have learned so far. *Cancer Res* **2020**, *12*, 1448.
2. Angelucci, A. Targeting Tyrosine Kinases in Cancer: Lessons for an Effective Targeted, Therapy in the Clinic. *Cancers* **2019**, *11*, 490.
3. Kim, L.C.; Song, L.; Haura, E.B. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2009**, *6*, 587-595.
4. Rai, K. Personalized cancer therapy: YES1 is the new kid on the block. *Cancer Res* **2019**, *79*, 5702-5703.
5. Kohmura, N.; Yagi, T.; Tomooka, Y.; Oyanagi, M.; Kominami, R.; Takeda, N.; Chiba, J.; Ikawa, Y.; Aizawa, S. A novel nonreceptor tyrosine kinase, Srm: cloning and targeted disruption. *Mol Cell Biol* **1994**, *14*, 6915-6925.
6. Stein, P.L.; Vogel, H.; Soriano, P. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases 640 in mutant mice. *Genes & development* **1994**, *8*, 1999-2007.
7. Uhlen, M.; Fagerberg, L.; Hallstrom, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Sivertsson, A.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **2015**, *347*, 126-419.
8. Uhlen, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Sjostedt, E.; Fagerberg, L.; Bidkhori, G.; Benfeitas, R.; Arif, M.; Liu, Z.; Edfors, F.; et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **2017**, *357*, 2507.
9. Wheeler, D.L.; Iida, M.; Dunn, E.F. The role of Src in solid tumors. *Oncologist* **2009**, *14*, 667-678.

10. Logue, J.S.; Cartagena-Rivera, A.X.; Chadwick, R.S. c-Src activity is differentially required by cancer cell motility modes. *Oncogene* **2018**, *37*, 2104-2121.
11. Zhao, L.; Li, X.; Song, N.; Li, A.; Hou, K.; Qu, X.; Che, X.; Liu, Y. Src promotes EGF-induced epithelial-to-mesenchymal transition and migration in gastric cancer cells by upregulating ZEB1 and ZEB2 through AKT. *Cell Biol Int* **2018**, *42*, 294-302.
12. Bailey, K.M.; Airik, M.; Krook, M.A.; Pedersen, E.A.; Lawlor, E.R. Micro-Environmental Stress Induces Src-Dependent Activation of Invadopodia and Cell Migration in Ewing Sarcoma. *Neoplasia* **2016**, *18*, 480-488.
13. Ngan, E.; Stoletov, K.; Smith, H.W.; Common, J.; Muller, W.J.; Lewis, J.D.; Siegel, P. LPP is a Src substrate required for invadopodia formation and efficient breast cancer lung metastasis. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15059.
14. Calgani, A.; Vignaroli, G.; Zamperini, C.; Coniglio, F.; Festuccia, C.; Di Cesare, E.; Gravina, G.L.; Mattei, C.; Vitale, F.; Schenone, S.; et al. Suppression of SRC Signaling Is Effective in Reducing Synergy between Glioblastoma and Stromal Cells. *Mol Cancer Ther* **2016**, *15*, 1535-1544.
15. Liu, S.T.; Pham, H.; Pandol, S.J.; Ptasznik, A. Src as the link between inflammation and cancer. *Front Physiol* **2013**, *4*, 416.
16. Destaing, O.; Sanjay, A.; Itzstein, C.; Horne, W.C.; Toomre, D.; De Camilli, P.; Baron, R. The tyrosine kinase activity of c-Src regulates actin dynamics and organization of podosomes in osteoclasts. *Mol Biol Cell* **2008**, *19*, 394-404.
17. Myoui, A.; Nishimura, R.; Williams, P.J.; Hiraga, T.; Tamura, D.; Michigami, T.; Mundy, G.R.; Yoneda, T. C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis. *Cancer Res* **2003**, *63*, 5028-5033.
18. Summy, J.M.; Gallick, G.E. Src family kinases in tumor progression and metastasis.

Cancer Metastasis Rev **2003**, 22, 337-358.

19. Kaplan, K.B.; Bibbins, K.B.; Swedlow, J.R.; Arnaud, M.; Morgan, D.O.; Varmus, H.E. Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *EMBO J* **1994**, 13, 4745-4756.

20. Wu, J.C.; Chen, Y.C.; Kuo, C.T.; Wenshin Yu, H.; Chen, Y.Q.; Chiou, A.; Kuo, J.C. Focal adhesion kinase-dependent focal adhesion recruitment of SH2 domains directs SRC into focal adhesions to regulate cell adhesion and migration. *Sci Rep* **2015**, 5, 18476.

21. Paladino, D.; Yue, P.; Furuya, H.; Acoba, J.; Rosser, C.J.; Turkson, J. A novel nuclear Src and p300 signaling axis controls migratory and invasive behavior in pancreatic cancer. *Oncotarget* **2016**, 7, 7253-7267.

22. Urciuoli, E.; Coletta, I.; Rizzuto, E.; De Vito, R.; Petrini, S.; D'Oria, V.; Pezzullo, M.; Milano, G.M.; Cozza, R.; et al. Src nuclear localization and its prognostic relevance in human osteosarcoma. *J Cell Physiol* **2018**, 233, 1658-1670.

23. Amata, I.; Maffei, M.; Pons, M. Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Front Genet* **2014**, 5, 181.

24. Chen, M.L.; Chai, C.Y.; Yeh, K.T.; Wang, S.N.; Tsai, C.J.; Yeh, Y.T.; Yang, S.F. Crosstalk between activated and inactivated c-Src in hepatocellular carcinoma. *Dis Markers* **2011**, 30, 325-333.

25. Boggon, T.J.; Eck, M.J. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **2004**, 23, 7918.

26. Chong, Y.P.; Ia, K.K.; Mulhern, T.D.; Cheng, H.C. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1754, 210-220.

27. Furlan, G.; Minowa, T.; Hanagata, N.; Kataoka-Hamai, C.; Kaizuka, Y. Phosphatase

- CD45 both positively and negatively regulates T cell receptor phosphorylation in reconstituted membrane protein clusters. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 28514-28525.
28. 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* **2005**, *23*, 233-244.
29. Kmiecik, T.E.; Shalloway, D. Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* **1987**, *49*, 65-73.
30. Wang, D.; Esselman, W.J.; Cole, P.A. Substrate conformational restriction and CD45- catalyzed dephosphorylation of tail tyrosine-phosphorylated Src protein. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 40428-40433.
31. Ostergaard, H.L.; Shackelford, D.A.; Hurley, T.R.; Johnson, P.; Hyman, R.; Sefton, B.M.; Trowbridge, I.S. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *PNAS* **1989**, *86*, 8959-8963.
32. Somani, A.K.; Bignon, J.S.; Mills, G.B.; Siminovitch, K.A.; Branch, D.R. Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 21113-21119.
33. Chiang, G.G.; Sefton, B.M. Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 23173-23178.
34. Baker, M.; Gamble, J.; Tooze, R.; Higgins, D.; Yang, F.T.; O'Brien, P.C.; Coleman, N.; Pingel, S.; Turner, M.; Alexander, D.R. Development of T-leukaemias in CD45 tyrosine phosphatase- deficient mutant lck mice. *The EMBO journal* **2000**, *19*, 4644-4654.
35. Zhang, S.Q.; Yang, W.; Kontaridis, M.I.; Bivona, T.G.; Wen, G.; Araki, T.; Luo, J.;

Thompson, J.A.; Schraven, B.L.; Philips, M.R.; et al. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* **2004**, *13*, 341-355.

36. Lombardo, L.J.; Lee, F.Y.; Chen, P.; Norris, D.; Barrish, J.C.; Behnia, K.; Castaneda, S.; Cornelius, L.A.; Das, J.; Doweyko, A.M.; et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* **2004**, *47*, 6658-6661.

37. Mitri, Z.; Nanda, R.; Blackwell, K.; Costelloe, C.M.; Hood, I.; Wei, C.; Brewster, A.M.; Ibrahim, N.K.; Koenig, K.B.; Hortobagyi, G.N.; et al. TBCRC-010: Phase I/II Study of Dasatinib in Combination with Zoledronic Acid for the Treatment of Breast Cancer Bone Metastasis. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 5706-5712.

38. Schott, A.F.; Barlow, W.E.; Van Poznak, C.H.; Hayes, D.F.; Moinpour, C.M.; Lew, D.L.; Dy, P.A.; Keller, E.T.; Keller, J.M.; Hortobagyi, G.N. Phase II studies of two different schedules of dasatinib in bone metastasis predominant metastatic breast cancer: SWOG S0622. *Breast Cancer Res Treat* **2016**, *159*, 87-95.

39. Somlo, G.; Atzori, F.; Strauss, L.C.; Geese, W.J.; Specht, J.M.; Gradishar, W.J.; Rybicki, A.; Sy, O.; Vahdat, L.T.; Cortes, J. Dasatinib plus capecitabine for advanced breast cancer: safety and efficacy in phase I study CA180004. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 1884-1893.

40. Ocana, A.; Gil-Martin, M.; Antolin, S.; Atienza, M.; Montano, A.; Ribelles, N.; Urruticoechea, A.; Falcon, A.; Pernas, S.; Orlando, J.; et al. Efficacy and safety of dasatinib with trastuzumab and paclitaxel in first line HER2-positive metastatic breast cancer: results from the phase II GEICAM/2010-04 study. *Breast Cancer Res Treat* **2019**, *174*, 693-701.

41. Zhang, S.; Huang, W.C.; Li, P.; Guo, H.; Poh, S.B.; Brady, S.W.; Xiong, Y.; Tseng, L.M.; Li, S.H.; et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* **2011**, *17*, 461-469.
42. Araujo, J.C.; Trudel, G.C.; Saad, F.; Armstrong, A.J.; Yu, E.Y.; Bellmunt, J.; Wilding, G.; McCaffrey, J.; Serrano, S.V.; Matveev, V.B.; et al. Docetaxel and dasatinib or placebo in men with metastatic castration-resistant prostate cancer (READY): a randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol* **2013**, *14*, 1307-1316.
43. Yu, E.Y.; Wilding, G.; Posadas, E.; Gross, M.; Culine, S.; Massard, C.; Morris, M.J.; Hudes, G.; Calabro, F.; Cheng, S.; et al. Phase II study of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 7421-7428.
44. Yu, E.Y.; Massard, C.; Gross, M.E.; Carducci, M.A.; Culine, S.; Hudes, G.; Posadas, E.M.; Sternberg, C.N.; Wilding, G.; Trudel, G.C.; et al. Once-daily dasatinib: expansion of phase II study evaluating safety and efficacy of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Urology* **2011**, *77*, 1166-1171.
45. Herold, C.I.; Chadaram, V.; Peterson, B.L.; Marcom, P.K.; Hopkins, J.; Kimmick, G.G.; Favaro, J.; Hamilton, E.; Welch, R.A.; Bacus, S.; et al. Phase II trial of dasatinib in patients with metastatic breast cancer using real-time pharmacodynamic tissue biomarkers of Src inhibition to escalate dosing. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 6061-6070.
46. Pusztai, L.; Moulder, S.; Altan, M.; Kwiatkowski, D.; Valero, V.; Ueno, N.T.; Esteva, F.J.; Avritscher, R.; Qi, Y.; Strauss, L.; et al. Gene signature-guided dasatinib therapy in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 5265-5271.
47. Algazi, A.P.; Weber, J.S.; Andrews, S.C.; Urbas, P.; Munster, P.N.; DeConti, R.C.; Hwang, J.; Sondak, V.K.; Messina, J.L.; McCalmont, T.; et al. Phase I clinical trial of the Src inhibitor dasatinib with dacarbazine in metastatic melanoma. *Br J Cancer* **2012**, *106*, 85-91.

48. Kalinsky, K.; Lee, S.; Rubin, K.M.; Lawrence, D.P.; Iafrate, A.J.; Borger, D.R.; Margolin, K.A.; Leitao, M.M., Jr.; Tarhini, A.A.; Koon, H.B.; et al. A phase 2 trial of dasatinib in patients with locally advanced or stage IV mucosal, acral, or vulvovaginal melanoma: A trial of the ECOG- ACRIN Cancer Research Group (E2607). *Cancer* **2017**, *123*, 2688-2697.
49. Kluger, H.M.; Dudek, A.Z.; McCann, C.; Ritacco, J.; Southard, N.; Jilaveanu, L.B.; Molinaro, A.; Sznol, M. A phase 2 trial of dasatinib in advanced melanoma. *Cancer* **2011**, *117*, 2202-2208.
50. Gold, K.A.; Lee, J.J.; Harun, N.; Tang, X.; Price, J.; Kawedia, J.D.; Tran, H.T.; Erasmus, J.J.; Blumenschein, G.R.; William, W.N.; et al. A phase I/II study combining erlotinib and dasatinib for non-small cell lung cancer. *Oncologist* **2014**, *19*, 1040-1041.
51. Lara, P.N., Jr.; Longmate, J.; Evans, C.P.; Quinn, D.I.; Twardowski, P.; Chatta, G.; Posadas, E.; Stadler, W.; Gandara, D.R. A phase II trial of the Src-kinase inhibitor AZD0530 in patients with advanced castration-resistant prostate cancer: a California Cancer Consortium study. *Anticancer Drugs* **2009**, *20*, 179-184.
52. Ujisaka, Y.; Onozawa, Y.; Kurata, T.; Yasui, H.; Goto, I.; Yamazaki, K.; Machida, N.; Watanabe, J.; Shimada, H.; Shi, X.; et al. First report of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of the Src kinase inhibitor saracatinib (AZD0530) in Japanese patients with advanced solid tumours. *Invest New Drugs* **2013**, *31*, 108-114.
53. Ucalp, A.; Sparano, J.A.; Caravelli, J.; Santamauro, J.; Patil, S.; Abbruzzi, A.; Pellegrino, C.; Bromberg, J.; Dang, C.; Theodoulou, M.; et al. Phase II trial of saracatinib (AZD0530), an oral SRC-inhibitor for the treatment of patients with hormone receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer* **2011**, *11*, 306-311.
54. Laurie, S.A.; Goss, G.D.; Shepherd, F.A.; Reaume, M.N.; Nicholas, G.; Philip, L.; Wang, L.; Schwock, J.; Hirsh, V.; Oza, A.; et al. A phase II trial of saracatinib, an

inhibitor of src kinases, in previously-treated advanced non-small-cell lung cancer: the princess margaret hospital phase II consortium. *Clin Lung Cancer* **2014**, *15*, 52-57.

55. Hannon, R.A.; Finkelman, R.D.; Clack, G.; Iacona, R.B.; Rimmer, M.; Gossiel, F.; Baselga, J.; Eastell, R. Effects of Src kinase inhibition by saracatinib (AZD0530) on bone turnover in advanced malignancy in a Phase I study. *Bone* **2012**, *50*, 885-892.

56. Osadas, E.M.; Ahmed, R.S.; Karrison, T.; Szmulewitz, R.Z.; O'Donnell, P.H.; Wade, J.L., 3rd; Shen, J.; Gururajan, M.; Sievert, M.; Stadler, W.M. Saracatinib as a metastasis inhibitor in metastatic castration-resistant prostate cancer: A University of Chicago Phase 2 Consortium and DOD/PCF Prostate Cancer Clinical Trials Consortium Study. *Prostate* **2016**, *76*, 286-293.

57. Renouf, D.J.; Moore, M.J.; Hedley, D.; Gill, S.; Jonker, D.; Chen, E.; Walde, D.; Goel, R.; Southwood, B.; Gauthier, I.; et al. A phase I/II study of the Src inhibitor saracatinib (AZD0530) in combination with gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *Invest New Drugs* **2012**, *30*, 779-786.

58. Kaye, S.; Aamdal, S.; Jones, R.; Freyer, G.; Pujade-Lauraine, E.; de Vries, E.G.; Barriuso, J.; Sandhu, S.; Tan, D.S.; Hartog, V.; et al. Phase I study of saracatinib (AZD0530) in combination with paclitaxel and/or carboplatin in patients with solid tumours. *Br J Cancer* **2012**, *106*, 1728-1734.

59. Trarbach, T.; Schultheis, B.; Gauler, T.C.; Schneider, V.; Strumberg, D.; Eberhardt, W.E.; Le Scouiller, S.; Marotti, M.; Brown, K.H.; Drevs, J. Phase I open-label study of cediranib, an oral inhibitor of VEGF signalling, in combination with the oral Src inhibitor saracatinib in patients with advanced solid tumours. *Invest New Drugs* **2012**, *30*, 1962-1971.

60. Powles, T.; Brown, J.; Larkin, J.; Jones, R.; Ralph, C.; Hawkins, R.; Chowdhury, S.; Boleti, E.; Bhal, A.; Fife, K.; et al. A randomized, double-blind phase II study evaluating cediranib versus cediranib and saracatinib in patients with relapsed metastatic clear-cell

renal cancer (COSAK). *Ann Oncol* **2016**, *27*, 880-886.

61. Daud, A.I.; Krishnamurthi, S.S.; Saleh, M.N.; Gitlitz, B.J.; Borad, M.J.; Gold, P.J.; Chiorean, E.G.; Springett, G.M.; Abbas, R.; Agarwal, S.; et al. Phase I study of bosutinib, a src/abl tyrosine kinase inhibitor, administered to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 1092-1100.

62. Campone, M.; Bondarenko, I.; Brinca, S.; Hotko, Y.; Munster, P.N.; Chmielowska, E.; Fumoleau, P.; Ward, R.; Bardy-Bouxin, N.; Leip, E.; et al. Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Ann Oncol* **2012**, *23*, 610-617.

63. Messersmith, W.A.; Krishnamurthi, S.S.; Hewes, B.A.; Zacharchuk, C.M.; Abbas, R.; Martins, P.; Dowling, E.; Volkert, A.; Martin, E.; Daud, A.I. 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**, *25*, 3552-3552.

64. Moy, B.; Neven, P.; Lebrun, F.; Bellet, M.; Xu, B.; Sarosiek, T.; Chow, L.; Goss, P.; Zacharchuk, C.; Leip, E.; et al. Bosutinib in combination with the aromatase inhibitor letrozole: a phase II trial in postmenopausal women evaluating first-line endocrine therapy in locally advanced or metastatic hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Oncologist* **2014**, *19*, 348-349.

65. Moy, B.; Neven, P.; Lebrun, F.; Bellet, M.; Xu, B.; Sarosiek, T.; Chow, L.; Goss, P.; Zacharchuk, C.; Leip, E.; et al. Bosutinib in combination with the aromatase inhibitor exemestane: a phase II trial in postmenopausal women with previously treated locally advanced or metastatic hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Oncologist* **2014**, *19*, 346-347.

66. Isakoff, S.J.; Wang, D.; Campone, M.; Calles, A.; Leip, E.; Turnbull, K.; Bardy-Bouxin, N.; Duville, L.; Calvo, E. Bosutinib plus capecitabine for selected advanced

solid tumours: results of a phase 1 dose-escalation study. *Br J Cancer* **2014**, *111*, 2058-2066.

67. Woodcock, V.K.; Clive, S.; Wilson, R.H.; Coyle, V.M.; Stratford, M.R.L.; Folkes, L.K.; Eastell, R.; Barton, C.; Jones, P.; Kazmi-Stokes, S.; et al. A first-in-human phase I study to determine the maximum tolerated dose of the oral Src/ABL inhibitor AZD0424. *Br J Cancer* **2018**, *118*, 770-776.

68. Carraro, F.; Pucci, A.; Naldini, A.; Schenone, S.; Bruno, O.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Brullo, C.; Fossa, P.; Menozzi, G.; et al. Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines endowed with antiproliferative activity on ductal infiltrating carcinoma cells. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1595-1598.

69. Carraro, F.; Naldini, A.; Pucci, A.; Locatelli, G.A.; Maga, G.; Schenone, S.; Bruno, O.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Brullo, C.; et al. Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines as potent antiproliferative and proapoptotic agents toward A431 and 8701-BC cells in culture via inhibition of c-Src phosphorylation. *J. Med.Chem.*, **2006**, *49*, 1549-1561.

70. Radi, M.; Tintori, C.; Musumeci, F.; Brullo, C.; Zamperini, C.; Dreassi, E.; Fallacara, A.L.; Vignaroli, G.; Crespan, E.; Zanolli, S.; 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.*, **2013**, *56*, 5382-5394.

71. Spreafico, A.; Schenone, S.; Serchi, T.; Orlandini, M.; Angelucci, A.; Magrini, D.; Bernardini, G.; Collodel, G.; Di Stefano, A.; Tintori, C.; et al. Antiproliferative and proapoptotic activities of new pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine derivative Src kinase inhibitors in human osteosarcoma cells. *FASEB J*, **2008**, *22*, 1560–1571.

72. Tintori, C.; Fallacara, A.L.; Radi, M.; Zamperini, C.; Dreassi, E.; Crespan, E.; Maga, G.; Schenone, S.; Musumeci, F.; Brullo, C.; et al. Combining x-ray crystallography and molecular

modeling toward the optimization of pyrazolo[3,4-d]pyrimidines as potent c-Src inhibitors active *in vivo* against neuroblastoma. *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 347-361.