

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 e valutazione biologica di inibitori di Src utilizzabili in
modelli preclinici di glioblastoma**

Relatrice:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Schenone

Candidato:

Giovanni B. Iannace

Anno Accademico 2020-2021

ABSTRACT

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore maligno più letale tra quelli che colpiscono il sistema nervoso centrale (SNC). L'anomala attivazione delle tirosina chinasi (TKs) causa una sovraregolazione della cascata di azioni a valle che coinvolge anche le TKs non recettoriali Src e Abl. L'ipeattivazione di Src promuove la proliferazione e la migrazione delle cellule ed è collegata alla progressione del tumore, alla neoangiogenesi e alla sua metastatizzazione. Tra le molecole identificate come inibitori di Src e attive sul GBM, si può annoverare il composto SI221. SI221 è stato sintetizzato dal gruppo di ricerca dove ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale e ha mostrato una migliore stabilità metabolica e maggior capacità di passare la barriera ematoencefalica (BEE) rispetto ad altre molecole che inibiscono Src, quale PP2. Sulla base di questi risultati, il gruppo di ricerca ha pensato di intraprendere un progetto volto alla scoperta di nuovi inibitori di Src e Abl con maggiore attività rispetto a SI221 sul GBM.

In particolare, si è partiti da molecole di precedente sintesi, attive come inibitori di Src e non ancora valutate per il trattamento del GBM per poi progettare e sintetizzare una nuova serie di composti potenzialmente attivi verso questo tumore. Tra questi, oggetto della mia tesi sperimentale di laurea sono i composti **11a-d**.

Le molecole da me sintetizzate sono state inviate al Dott. Maga e ai suoi collaboratori dell'Istituto di Genetica Molecolare del CNR-Pavia per i saggi biologici. Dai test enzimatici effettuati, i composti **11a,b** sono risultati i più attivi e meritevoli di ulteriori approfondimenti e sviluppi.

Sommario

1. INTRODUZIONE	4
1.1 TIROSINA CHINASI RECETTORIALI E GBM	5
1.2 CHINASI SRC	6
1.3 MICROAMBIENTE TUMORALE E INFIAMMAZIONE	7
1.3.1 SRC MODULA L'INFIAMMAZIONE NEL MICROAMBIENTE TUMORALE	9
1.3.2 RIPROGRAMMAZIONE METABOLICA E MICROAMBIENTE TUMORALE	10
1.3.3 SRC MODULA LA RIPROGRAMMAZIONE NEL MICROAMBIENTE TUMORALE	12
1.4 SRC COME BERSAGLIO TERAPEUTICO NEL GLIOBLASTOMA	14
1.4.1 DASATINIB	16
1.4.2 PP2	18
1.4.3 BOSUTINIB	18
1.4.4 SARACATINIB	19
1.4.5 SU6656	20
1.4.6 PONATINIB	21
1.4.7 SI221	22
2. PROGETTO	28
3. DISCUSSIONE	31
3.1 CHIMICA	31
3.2 BIOLOGIA	34
4. CONCLUSIONI	36
5. PARTE SPERIMENTALE	37
5.1 CHIMICA	37
6. BIBLIOGRAFIA	47

1. INTRODUZIONE

Il glioblastoma multiforme (GBM) è il tumore maligno più comune e letale tra quelli che colpiscono il sistema nervoso centrale (SNC). La sopravvivenza media dei pazienti è tra i 13 e i 15 mesi e la sopravvivenza a 5 anni è estremamente bassa, intorno al 5% [1].

Il GBM è stato il primo tipo di tumore ad essere sistematicamente studiato dalla “Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA)” [2]. L’analisi genomica e trascrittomica ha identificato una deregolazione delle proteine TP53, RB1 e di varie tirosina chinasi (TK) nella patogenesi del GBM [3]. L’attivazione anomala di alcune TK provoca una sovraregolazione della cascata di segnalazione a valle che coinvolge l’attivazione delle vie chinasiche di MAPK e ERK e delle TK non recettoriali, tra cui Src e Abl [4].

La malignità del GBM è causata dalla larga eterogeneità delle cellule cancerose che sono in continua evoluzione. Le cellule tumorali e non, nel microambiente tumorale (tumor microenvironment, TME), cooperano alla promozione dell’espressione anomala di un gruppo di citochine infiammatorie che innescano la neoangiogenesi e l’evasione dalla risposta immunitaria, aumentando ulteriormente l’aggressività del tumore [5]. Inoltre, la cooperazione tra cellule tumorali e non nel TME garantisce l’adattamento delle cellule tumorali, sfruttando riprogrammazioni metaboliche necessarie a promuovere la crescita tumorale [6]. Il trattamento del GBM comprende la resezione chirurgica, seguita da radioterapia e contemporaneamente da una chemioterapia di supporto con Temozolomide (TMZ) [7].

Il TMZ è un agente alchilante somministrato per via orale che aumenta anche le specie reattive dell’ossigeno (ROS), causando danni a livello del DNA e inducendo la morte per apoptosi delle cellule. Anche se la terapia con TMZ produce inizialmente effetti terapeutici, il GBM solitamente sviluppa resistenza a questo farmaco, portando ad una bassa percentuale di sopravvivenza [7]. I principali meccanismi di resistenza sono associati all’eterogeneità e

all'evoluzione del tumore, alla sostenuta produzione di citochine infiammatorie, al rinnovamento del metabolismo ed infine, all'anomala funzionalità della risposta al danno del DNA e ai suoi meccanismi di riparazione [8-11].

Le connessioni tra un'alterata attivazione del segnale delle TKs nel GBM e la sua resistenza alla terapia sono state soltanto parzialmente identificate.

1.1. TIROSINA CHINASI RECETTORIALI E GBM

Studi sul genoma umano hanno identificato un'anomala funzionalità delle tirosina chinasi recettoriali (RTKs) come caratteristica principale del GBM [3]. Tra queste RTKs il Recettore del Fattore di Crescita Epidermica (EGFR) è costitutivamente attivato in circa il 57% dei casi di GBM. EGFR (ErbB1) è una RTK che appartiene alla famiglia ErbB. In condizioni normali, EGFR viene attivato in seguito al legame con i suoi ligandi specifici, tra cui il Fattore di Crescita Epidermico (EGF). Nel GBM questa regolazione è frequentemente persa e il segnale EGFR è quindi sovra regolato a causa di una serie di meccanismi indipendenti dai fattori di crescita. L'espressione di EGFR può essere aumentata a causa dell'amplificazione della regione del cromosoma 7 o può essere costitutivamente attivata da specifiche mutazioni. La mutazione più comune dell'EGFR, EGFR variant v (III), ha un dominio extracellulare modificato ed è costitutivamente attiva nel GBM, indipendentemente dall'EGF [12].

Oltre alla deregolazione dell'EGFR, il GBM è spesso caratterizzato da una anomala attivazione di altre RTK. Complessivamente, è stata trovata almeno una RTK alterata nel 67,3% dei GBM e in alcuni contesti, l'eterogeneità del tumore include una simultanea deregolazione di due RTK [12]. La prevalenza dell'attivazione anomala di EGFR nel GBM rende questa chinasi un target eccellente per potenziali terapie. Infatti, negli ultimi anni sono stati sviluppati approcci terapeutici basati sugli inibitori di EGFR e sono in corso studi clinici, sebbene i risultati finora

ottenuti siano stati piuttosto deludenti [12]. L'eterogeneità del tumore e la sua evoluzione così come la ridondanza dei segnali spiega la resistenza primaria o acquisita nella maggiore parte dei casi. Poiché le RTK condividono diversi effettori a valle che partecipano alla segnalazione chinasi, una strategia alternativa potrebbe basarsi sull'identificazione di targets a valle delle RTKs, quali la TK citoplasmatica Src.

1.2. CHINASI SRC

Src è stato il primo oncogene identificato [13-15] ed è il capostipite di un gruppo di tirosina chinasi non recettoriali, denominate Src family kinases (SFKs), che mostrano una regione N-terminale che può essere miristilata e può promuovere l'interazione con la membrana plasmatica, una regione unica (unique domain) specifica per ogni membro della SFK, un dominio SH3 (SRC Homology 3), un dominio SH2 che regola l'interazione di Src con i residui di tirosina fosforilati, consentendo interazioni intramolecolari e intermolecolari, e un dominio SH1, che è il dominio catalitico della chinasi [16]. Lo studio della struttura di Src ha rivelato un complesso di interazioni intramolecolari che assicurano la modulazione della sua attività [16,17]. Nel cancro, l'attività delle chinasi Src è spesso sovraregolata in modo aberrante, e ciò porta alla trasduzione anomala della sua cascata di segnali, che può promuovere la proliferazione e la migrazione delle cellule ed è stata collegata alla progressione del tumore, alla neoangiogenesi e metastatizzazione [18,19]. È stato dimostrato che l'attività delle SFK, è sovra regolata nel GBM rispetto al tessuto cerebrale sano [20]. Inoltre, un'elevata attività di Src è stata riportata anche in un pannello di linee di cellule di GBM [21]. È importante sottolineare che nel GBM il gene Src non è amplificato né mutato e i suoi livelli di espressione di mRNA non risultano aumentati [2], indicando come il coinvolgimento Src nel GBM, analogamente ad altri tumori, si basi principalmente sulla sua iperattivazione [18,19]. Tale iperattivazione può

contribuire significativamente ad aumentare alcuni processi, tra cui l'infiammazione e il metabolismo, che contribuiscono all'instaurazione del microambiente tumorale e allo sviluppo della patologia. Queste evidenze suggeriscono che Src può essere un target importante per inibire questi processi e quindi interferire con la crescita del tumore.

1.3.MICROAMBIENTE TUMORALE E INFIAMMAZIONE

Una delle principali forze trainanti del GBM è collegata al suo TME che contribuisce alla grande eterogeneità di questo tumore e supporta in modo significativo la crescita del tumore stesso.

Il TME è formato da tutte le cellule non cancerose interne al tumore (cellule stromali) quali astrociti, fibroblasti, cellule immunitarie, microglia/macrofagi, cellule endoteliali e periciti. In aggiunta sono presenti cellule staminali di glioblastoma (GSCs), una piccola popolazione di cellule con proprietà invasive e proliferative, che conferiscono al tumore l'abilità di invadere i tessuti sani del cervello e contribuire così alla resistenza nei confronti della terapia [22]. Biomolecole proteiche e non proteiche (i.e., polisaccaridi, ormoni, ossido nitrico, ecc.), prodotte da tutti i tipi di cellule presenti nel TME, insieme alla una matrice extracellulare (ECM) alterata e al fluido interstiziale contribuiscono al complesso del TME e alla sua capacità di favorire la crescita del tumore [5].

È importante sottolineare che un pool significativo di citochine pro-infiammatorie, chemochine e fattori di crescita è secreto dal cancro e dalle cellule non cancerose che concorrono a sostenere l'azione del TME. Questo evento è innescato dall'attivazione di fattori di trascrizione pro-infiammatori, come STAT3, NF-kb [10,23,24]. Si osserva pertanto un aumento della proliferazione, invasività e/o potenziale sviluppo delle cellule staminali del GBM [25].

In particolare, cellule monocitiche con diversa origine (i.e, macrofagi associati a tumori o TAM) sono reclutate all'interno del TME insieme con la microglia residente dalle GSC. Tutte queste cellule sono definite Glioma-Associated Microglia/Macrophages (GAM) [5]. Secernendo fattori immuno-modulatori, le GAM orchestrano le altre cellule immunitarie che entrano nel cervello, portando così all'infiammazione cronica e facilitando la proliferazione, sopravvivenza e invasione del tumore. Questi fattori immuno-modulatori includono citochine (come TGF- β), chemochine, e fattori di crescita (inclusi fattore di crescita dei fibroblasti, FGF-2, e fattore stimolante le colonie granulociti-monociti, GM-CSF) [25,26]. Tra questi, il TGF- β rilasciato dai TAM, induce l'espressione delle metalloproteinasi di matrice (MMP) da parte del tumore, promuovendo il rimodellamento e la degradazione della matrice extracellulare, aumentando così l'invasione di GSC. Inoltre, il TGF- β secreto dalle GSC, promuove il fenotipo immunosoppressivo M2 dei GAM, inibendo così la proliferazione delle cellule T e promuovendo la progressione del tumore [25,26].

Il TME quindi ha un ruolo primario nella progressione del tumore [27,28] e nella resistenza alla terapia [10,29-31].

L'attuale terapia standard si rivolge prevalentemente alle cellule non staminali, ma è fondamentalmente inefficace contro la piccola popolazione di GSC che è in ultima analisi responsabile della recidiva del tumore [22]. In aggiunta, gli alti livelli di fattori infiammatori, come IL-6, IL-8, sono stati identificati sia nei terreni di diverse linee cellulari di GBM sia nel microambiente dei campioni clinici. Questi fattori sostengono il processo infiammatorio all'interno del TME e danno un significativo contributo alla resistenza alla TMZ *in vitro* [10,32,33].

1.3.1. SRC MODULA L'INFIAMMAZIONE NEL MICROAMBIENTE TUMORALE

Molti studi hanno mostrato che il network dei segnali di Src ha un ruolo chiave nella regolazione del dinamismo del TME. L'attivazione di Src innesca la segnalazione a valle attraverso i percorsi RAS/MAPK e PI3K/AKT, promuovendo la proliferazione, la sopravvivenza e l'invasione tumorale [34].

Inoltre, Src influenza la distribuzione dei componenti delle proteine di adesione focale e regola il segnale delle integrine e l'espressione delle proteine ECM [35,36]. Quindi, alterazioni dei livelli di Src portano alla riduzione dell'interazione cellula-cellula e dell'adesione cellula-ECM, supportando i cambiamenti di TME.

Inoltre, è stato dimostrato che Src può modulare il dinamismo del TME e anche regolare il movimento e le infiltrazioni delle cellule immunitarie nel tumore [37]. È interessante notare che l'iperattivazione di Src potrebbe verificarsi sia nelle cellule tumorali sia nelle cellule infiammatorie immunitarie a causa del rilascio delle citochine infiammatorie nel TME [38,39]. L'iperattivazione di Src a sua volta può promuovere l'attivazione o la sovra espressione di fattori di trascrizione pro-infiammatori [40,41]. In particolare, le cellule tumorali rilasciano chemochine che permettono l'attivazione di Src nelle cellule immunitarie, che a loro volta rilasciano altre citochine attivando reciprocamente Src nelle cellule tumorali attraverso un meccanismo di feedback positivo. Pertanto, l'attivazione di Src è guidata da citochine pro-infiammatorie e, a sua volta, la produzione di citochine è guidata da Src in un dialogo incrociato tra tumore e infiammazione [37].

L'infiammazione nel GBM è correlata alla crescita tumorale [10]. Tuttavia, i percorsi coinvolti nella produzione di citochine nelle cellule GBM, così come il ruolo di Src in esso, non sono stati ancora completamente chiariti.

In generale, nei tumori la mutazione dell'oncogene RAS attiva la produzione di citochine [10,42,43]. Sebbene la mutazione RAS non sia generalmente coinvolta nella fisiopatologia del GBM, l'amplificazione di EGFR o l'espressione della forma mutata EGFRvIII possono portare alla deregolamentazione delle vie RAS e PI3K/AKT. La deregolamentazione dell'EGFR nel GBM determina una forte induzione e secrezione di IL-6 e IL-8 [44,10,45]. È interessante notare che l'EGFR e il mutante EGFRvIII promuovono l'attività di NF-kB tramite meccanismi indipendenti e dipendenti da AKT, supportando ulteriormente la produzione di citochine [46,47].

In aggiunta, è stato recentemente osservato che l'espressione della caspasi-8 nel GBM promuove l'attivazione di NF-kB, la produzione di citochine e la crescita del tumore *in vivo* [33,48]. È importante sottolineare che l'attivazione anomala di Src in linee cellulari di GBM promuove la fosforilazione della caspasi-8, portando alla trasformazione neoplastica [49]. Sulla base di questi dati, si può ipotizzare che Src promuova l'attività di NF-kB e quindi il TME, fosforilando la caspasi-8.

1.3.2. RIPROGRAMMAZIONE METABOLICA E MICROAMBIENTE TUMORALE

Le cellule cancerose si basano principalmente sulla glicolisi per la produzione di energia. L'effetto Warburg, descritto da Otto Warburg nel 1925, spiega come le cellule cancerose modificano il loro metabolismo per sostenere la richiesta di alta energia e di biomolecole, utilizzando preferibilmente la glicolisi piuttosto che la fosforilazione ossidativa per produrre ATP [50]. Mentre nelle cellule normali il glucosio è metabolizzato attraverso la glicolisi a piruvato per produrre infine energia, nelle cellule tumorali avviene la glicolisi aerobica, che sposta la produzione di piruvato dal glucosio alla generazione di lattato, anche in condizioni normossiche. In tal modo, le cellule tumorali producono una quantità inferiore di ATP (2

rispetto alle 36 molecole prodotte dalla fosforilazione ossidativa). Nonostante ciò, l'effetto Warburg dà un vantaggio selettivo alle cellule di GBM altamente proliferanti, supportato da un'elevata disponibilità di molecole essenziali per la biosintesi di nucleotidi, lipidi e amminoacidi. È stato dimostrato che le cellule di GBM metabolizzano più del 90% del glucosio attraverso la glicolisi aerobica per produrre NADPH e lattato [51]. È importante sottolineare che la secrezione di lattato sostiene la creazione di un TME acido che supporta fortemente la crescita, l'invasione e la vascolarizzazione del tumore e che contribuisce all'evasione immunitaria [52,53]. Il suo rilascio nello spazio extracellulare, infatti, innesca il reclutamento di cellule mieloidi attorno al tumore. Tra questi, macrofagi e microglia acquisiscono un fenotipo immunosoppressivo tumorigenico, che aiuta la crescita del tumore, l'invasione e l'angiogenesi [53,54]. È stato dimostrato che l'acidificazione stromale promuove l'attivazione delle MMP, facilitando così la migrazione e l'infiltrazione delle cellule tumorali [55]. Inoltre, il targeting farmacologico dell'efflusso di lattato dalle cellule di GBM influenza fortemente la sopravvivenza e l'invasività del tumore, suggerendo l'esplorazione di approcci terapeutici volti a spostare il metabolismo delle cellule tumorali e prevenire l'efflusso di lattato [56]. Tuttavia, il targeting metabolico nel GBM è particolarmente difficile, principalmente a causa dell'elevata eterogeneità di questo tumore in cui le cellule tumorali possono non dipendere solo dall'effetto Warburg. In effetti, parecchi nuovi studi sostengono l'idea che la fosforilazione ossidativa mitocondriale sia mantenuta anche nelle cellule tumorali, guidando così la tumorigenesi e la resistenza alla terapia, almeno in parte [57,58]. Ad esempio, le GSC differiscono metabolicamente dalla proliferazione di cellule tumorali che preferiscono la respirazione ossidativa mitocondriale [59]. Di conseguenza, l'inibizione della fosforilazione ossidativa nelle cellule tumorali può contribuire a combattere la sopravvivenza delle cellule tumorali stesse [60-62]. In linea con questa eterogeneità, si osserva una diversa deregolamentazione della via del pentoso fosfato (PPP), che produce fisiologicamente NADPH e pentoso fosfati, in relazione

alle diverse cellule all'interno del tumore. La dipendenza dalla PPP nel GBM, generalmente assicurata dalla sovraregolazione di enzimi produttori di NADPH, cioè isocitrato deidrogenasi 1 (IDH1) e glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PDH) [63,64], è un meccanismo di sopravvivenza che conferisce alle cellule di glioma ad alto tasso di proliferazione, la possibilità di attivare in modo continuo le vie biosintetiche [65] e contribuisce alla resistenza alla terapia [63]. È importante sottolineare che la presenza di TME ipossico influenza fortemente la riprogrammazione metabolica e il passaggio tra PPP e glicolisi [66]. In effetti, l'ipossia promuove la sovraregolazione degli enzimi glicolitici, sostenendo la migrazione e il fenotipo invasivo, per sfuggire al danno ipossico. Al contrario, le cellule di glioma nelle aree vascolarizzate del tumore sono altamente proliferanti e prevalentemente sostenute da PPP [67,68]. Nel complesso, le cellule tumorali GBM e le cellule non tumorali TME si influenzano a vicenda e sfruttano reciprocamente la riprogrammazione metabolica per sostenere la progressione e la sopravvivenza del cancro. Complessivamente, l'elevata dipendenza del GBM dai cambiamenti metabolici sopra descritti suggerisce che l'inibizione dei percorsi chiave coinvolti nella riprogrammazione potrebbe aiutare a combattere la progressione del cancro e, soprattutto, la resistenza alla terapia. Il ruolo delle tirosina chinasi recettoriali e non recettoriali nella riprogrammazione metabolica è stato ampiamente studiato [69,70].

1.3.3. SRC MODULA LA RIPROGRAMMAZIONE NEL MICROAMBIENTE NATURALE

Gli enzimi metabolici sono finemente regolati per soddisfare la domanda di energia cellulare. Le modificazioni post-trasduzionali, prima di tutto la fosforilazione, attivano o inibiscono fortemente l'attività enzimatica [71]. Una correlazione tra l'attivazione di Src e la conseguente fosforilazione della esochinasi 1 (HK1), enzima limitante la velocità della glicolisi, è stata

identificata in diversi tumori incluso il GBM [72]. Src attivato, infatti, interagisce sia con HK1 che con l'isoforma esochinasi 2 (HK2) e le fosforila, attivando quindi gli enzimi. Questa modifica induce la glicolisi e promuove la crescita cellulare, la tumorigenesi e l'invasione. È interessante notare che la fosforilazione di HK1 e HK2 dipendente da Src porta alla produzione di glucosio-6-fosfato intermedio, stimolando sia la glicolisi che la PPP [72,73]. Inoltre, l'attività di Src aumenta l'assorbimento del glucosio tramite HK1 e HK2 [72], anche se questo meccanismo non è ancora chiaro. Nel lontano 1987 la sovraespressione dell'oncogene Src nei fibroblasti di topo 3T3 è stata segnalata come responsabile della sovraespressione dei trasportatori del glucosio e, coerentemente, dell'aumento dell'assorbimento del glucosio [74]. Ciò suggerisce che l'attività di Src può anche influenzare il metabolismo attraverso la modifica dell'espressione genica, probabilmente attivando funzioni alternative di proteine note. In effetti, alcuni studi indicano che HK2 agisce come un co-attivatore del fattore di trascrizione NRF2 in cellule di glioma stressate per modulare i geni maggiormente coinvolti nell'omeostasi redox [75]. Questo supporta il ruolo critico di HK2 nella tumorigenesi del GBM. Infatti, HK2, espressa prevalentemente nelle cellule embrionali in proliferazione, è espressa in modo aberrante nel GBM, dove guida la glicolisi aerobica, la proliferazione incontrollata, l'invasione e la resistenza alla terapia [76].

Src modula l'assorbimento del glucosio e il metabolismo nel cancro al seno agendo su una trasduzione ERk1/2-dipendente di MYC, che a sua volta promuove la trascrizione di GLUT1 [77]. Successivamente, l'interazione tra Src e MYC è stata descritta in diversi altri tumori, come il melanoma, il linfoma non Hodgkin, l'osteosarcoma e il cancro del polmone [78-81]. Sebbene il collegamento tra Src e MYC non sia stato dimostrato nel GBM, questa osservazione è potenzialmente interessante. Infatti, è ben noto che il gene MYC è sovraregolato in diversi tipi di GBM [82,83] e che sostiene la capacità di auto-rinnovamento e tumorigenicità delle GSC [84,85]. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che MYC guida la glicolisi e la dipendenza del

tumore dai metaboliti necessari per la glicolisi nel GBM [86]. L'attività aberrante di Src nel GBM insieme all'importante ruolo di MYC, conduce ad ipotizzare che l'asse SRC-MYC possa avere un ruolo anche in questo contesto e rafforza l'ipotesi che l'inibizione di Src possa aiutare a sconfiggere l'adattamento dei tumori associati, tra cui la riprogrammazione metabolica dipendente da MYC. È stato dimostrato che Src può influenzare la glicolisi nelle cellule tumorali attraverso una fosforilazione diretta del piruvato deidrogenasi (PDH), inibendone la sua attività e guidando l'effetto Warburg [87]. Queste evidenze da un lato sottolineano il ruolo di Src nel guidare la riprogrammazione metabolica e dall'altro dimostrano chiaramente la localizzazione mitocondriale di Src, come osservato in precedenza [88-91].

Il ruolo della fosforilazione di Src nella funzionalità mitocondriale è stato ampiamente descritto [92,93]. Anche in cellule normali, è stato dimostrato che Src sostiene la funzionalità mitocondriale, fosforilando e attivando la subunità del complesso I NDUFB10 [94]. Sorprendentemente, Src fosforila EGFRvIII e quindi promuove la sua traslocazione ai mitocondri. Questo evento migliora la funzionalità mitocondriale e la fosforilazione ossidativa, supportando la crescita del tumore anche in presenza di deprivazione di glucosio e può parzialmente contribuire al fallimento di terapie mirate all'EGFR [95].

1.4. SRC COME BERSAGLIO TERAPEUTICO NEL GLIOBLASTOMA

Come sottolineato in precedenza, l'iperattivazione della chinasi Src nel GBM è frequentemente osservata come una conseguenza della segnalazione aberrante delle RTKs. Questa osservazione suggerisce che Src possa rappresentare un punto nodale condiviso dall'attivazione anomala di differenti RTKs e quindi la sua inibizione potrebbe portare a superare la resistenza alla terapia. Inoltre, il suo ruolo nella risposta infiammatoria e nella riprogrammazione del metabolismo che

sostiene complessivamente il microambiente tumorale, indica che Src potrebbe essere un valido target per il miglioramento del trattamento del GBM [96].

Vengono di seguito riportate diverse molecole e strategie che hanno come target Src e le problematiche connesse al loro uso.

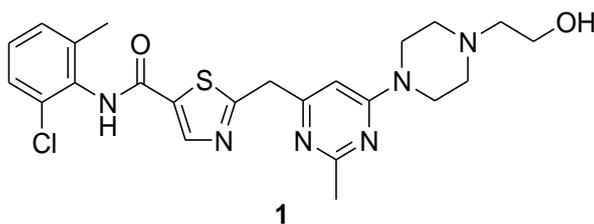
La maggior parte degli inibitori di tirosina chinasi (TKIs) si legano al sito catalitico della chinasi, in cui si lega l'ATP, e sono quindi inibitori competitivi dell'ATP stesso. Il sito catalitico è conservato tra le varie chinasi, e ciò rappresenta una potenziale causa di reattività incrociata [97]. Infatti, i TKIs mostrano una scarsa selettività che potrebbe portare ad effetti clinici non attesi, vantaggiosi o meno, a seconda del contesto tumorale [17,98]. Come riportato in diverse reviews [99,100] alcune piccole molecole Inibitori della tirosina chinasi Src (STKIs), approvate dalla FDA e dall'EMA, come Dasatinib, Bosutinib, Saracatinib e Ponatinib, sono state inizialmente sviluppate come inibitori doppi Src/Abl e alcune di loro sono attualmente in uso principalmente per i tumori ematologici, mentre nessun effetto completamente soddisfacente è stato finora osservato per i tumori solidi e in particolare per GBM.

Di seguito discuteremo lo stato dell'arte degli studi volti a valutare il ruolo dei composti mirati a Src nel trattamento del GBM *in vitro*, in approcci singoli e combinati (**Tabella 1**).

Tabella 1: Inibitori della tirosina chinasi Src sperimentati nel trattamento del glioblastoma

STKIs	Meccanismo di azione
DASATINIB	ATP-competitivo
PP2	ATP-competitivo
BOSUTINIB	ATP-competitivo
SARACATINIB	ATP-competitivo
SU6656	ATP-competitivo
PONATINIB	ATP-competitivo
SI221	ATP-competitivo

1.4.1. DASATINIB



Dasatinib è un potente inibitore multi-chinasico di seconda generazione approvato nel giugno 2006 dalla FDA per il trattamento della leucemia mieloide cronica (LMC) e del sottotipo Philadelphia-positivo di pazienti con leucemia linfoblastica acuta (LLA Ph+), visto il suo alto potenziale di inibire Bcr-Abl e disattivare la sua segnalazione aberrante in questa patologia [101]. Successivamente, diversi studi hanno dimostrato la capacità di Dasatinib di legare fino a 30 chinasi differenti, come dimostrato dall'analisi proteomica, in contrasto con altri TKI come Imatinib o Nilotinib, che agiscono su un minor numero di chinasi. [102,103]. Pertanto, esso mostra elevata efficacia nel trattamento di pazienti con LMC resistenti a Imatinib [104-106]. Dasatinib inibisce non solo Src e altre SFKs, ma anche c-Kit, EPHA2 e PDGFR. Per questo motivo, la possibilità di utilizzare Dasatinib per il trattamento del GBM sembrava promettente per disattivare la segnalazione aberrante di diverse tirosina chinasi e per sensibilizzare le cellule agli approcci chemioterapici canonici. A questo proposito, studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che Dasatinib influenza la migrazione, la proliferazione e la morfologia delle cellule GBM attraverso la sua attività inibitoria sulla chinasi Src [19,21,107,108]. Inoltre, si è visto che il trattamento con Dasatinib induce la morte cellulare autofagica principalmente in combinazione con TMZ, portando così ad un aumento significativo della sensibilità alla terapia con TMZ.

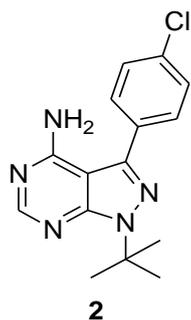
È interessante notare che gli esperimenti che utilizzano cellule GBM resistenti a TMZ, xenotrapiantate ortotopicamente in topi, hanno evidenziato che la somministrazione di Dasatinib in combinazione con Bevacizumab riduce significativamente l'invasione delle cellule di glioma [110].

Sfortunatamente, nonostante questi studi preclinici positivi, uno studio clinico di fase II (NCT00892177) ha recentemente riportato il fallimento del co-trattamento con Dasatinib e Bevacizumab in pazienti con GBM ricorrente, dimostrando che la combinazione di questi due farmaci non migliora i risultati dei pazienti affetti da GBM, rispetto al singolo trattamento con Bevacizumab [111]. Inoltre, un altro studio clinico di fase II (NCT00423735) ha riportato una mancanza di attività di Dasatinib contro il GBM ricorrente [112,113]. Si presumeva che il problema principale fosse l'insufficiente passaggio del farmaco oltre la barriera ematoencefalica (BEE). Questa ipotesi è stata confermata da Agawarl et al. nel 2019 [114]. Sono stati avviati diversi studi clinici per valutare meglio le potenzialità di Dasatinib; tuttavia, i loro risultati sono parzialmente disponibili e non conclusivi (**Tabella 2**).

Tabella 2: Studi clinici per il trattamento del GBM con STKIs

Nome STKIs	Studi clinici (numero NCT)	Co-trattamenti	Status
DASATINIB	NCT00423735	No	Completato
	NCT00892177	BEVACIZUMAB	Completato
	NCT00869401	IR/TMZ	Completato
	NCT00948389	LOMUSTINA	Interrotto
	NCT00895960	IR/TMZ	Interrotto
	NCT00609999	ERLOTINIB	Completato
	NCT00734864	TMZ	Ritirato
BOSUTINIB	NCT01331291	No	Completato
PONATINIB	NCT02478164	No	Completato

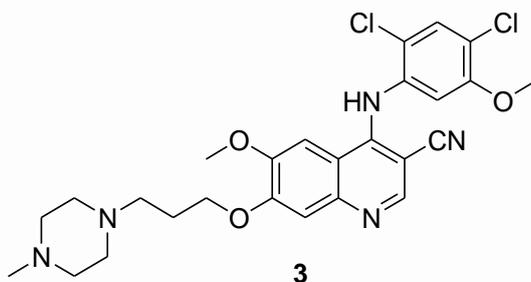
1.4.2. PP2



PP2 è un STKI selettivo descritto per la prima volta nel 1996 per la sua capacità di inibire alcuni membri della famiglia Src [115]. Attraverso la sua azione sulla via Src, PP2 influenza la proliferazione e la migrazione delle cellule di GBM. Il trattamento con PP2 previene la formazione dipendente da Src di complessi CAS/Crk/RAC responsabili della riorganizzazione citoscheletrica, bloccando così il processo di migrazione [116]. Inoltre, PP2 inibisce anche la migrazione cellulare influenzando la fosforilazione della Caveolina-1 mediata da Src [117].

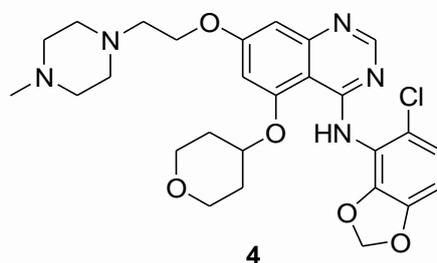
È stato dimostrato che PP2 aumenta la radiosensibilità nelle cellule U251 e T98G, sopprimendo la secrezione di MMP2, che è ben noto promuovere l'invasione cellulare e la resistenza alla terapia [118,119]. PP2 compromette la migrazione cellulare e l'invasione *in vitro*, promuovendo l'espressione di E-caderina e inibendo l'espressione di VEGF ed EphA2. È interessante notare che la combinazione di PP2 e il trattamento standard del glioma (radioterapia con TMZ) riduce la crescita del tumore nei topi nudi [119].

1.4.3. BOSUTINIB



Bosutinib (SKI-606) è un TKI di terza generazione che agisce sia su Src che su Abl. Come Dasatinib, è stato approvato dalla FDA per uso terapeutico per pazienti con CML resistente al trattamento con Imatinib a causa di mutazioni Abl-Bcr [120]. Taylor et al. hanno osservato che sebbene Bosutinib abbia una bassa penetrazione cerebrale, è comunque sufficiente per raggiungere la concentrazione del farmaco che inibisce l'attività della chinasi Src, *in vitro*. Tuttavia, uno studio di fase II ha dimostrato che Bosutinib in monoterapia non è associato ad attività antitumorale nei pazienti affetti da GBM ricorrente [121] (**tabella 2**). La causa del fallimento del trattamento con Bosutinib in questo studio non è ancora chiara. Potrebbe dipendere dallo stato di attivazione di Src nei pazienti con GBM ricorrente o potrebbe essere dovuto alla bassa penetrazione di farmaco nel tumore cerebrale, che rimane il problema principale dei TKI.

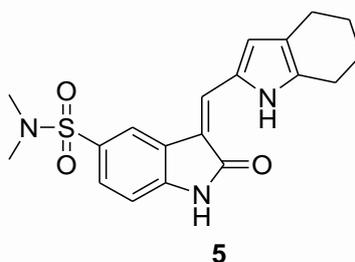
1.4.4. SARACATINIB



Saracatinib (AZD0530) è un inibitore doppio di SFKs e Abl. I suoi effetti antiproliferativi sono stati osservati in linee cellulari di cancro alla prostata, dove il composto sopprime l'attivazione di Src, portando così all'arresto della crescita cellulare [122]. Inoltre, è stato dimostrato che Saracatinib inibisce la migrazione *in vitro* e l'invasione di cellule tumorali mammarie resistenti al trattamento con Lapatinib. Queste cellule sono caratterizzate da un'attivazione deregolamentata di diverse vie che potrebbe indurre la loro resistenza a Lapatinib [123]. È stato considerato il possibile ruolo di Saracatinib nell'interferire con segnali STAT3 aberranti e migliorare il trattamento del GBM. GBM mostra un'eccessiva attivazione del percorso Src

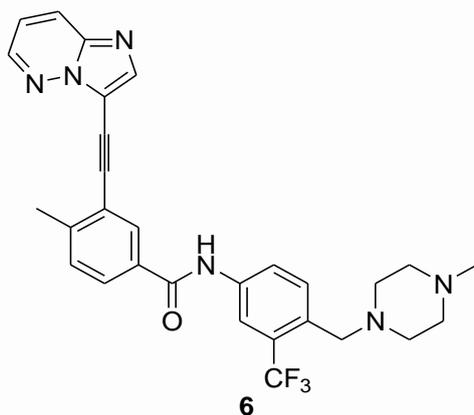
come descritto sopra e, di conseguenza, della proteina STAT3 che si traduce nell'attivazione di diversi eventi correlati con la sopravvivenza cellulare, crescita, apoptosi, differenziazione e infiammazione [124-126]. Per questo motivo, Liu et al. hanno studiato una nuova strategia per colpire il GBM basata sulla combinazione di vettori lentivirali per esprimere siRNA mirati a STAT3 e Saracatinib. La terapia combinata ha aumentato il tasso di apoptosi delle cellule di GBM *in vitro* e ha ridotto la crescita del tumore *in vivo* in modo più efficiente del singolo trattamento. Saracatinib come monoterapia *in vivo* è meno efficiente forse a causa del metabolismo del farmaco e della resistenza tumorale al farmaco stesso [127].

1.4.5. SU6656



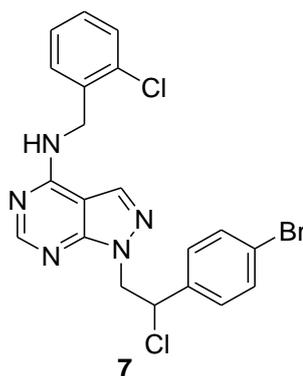
SU6656 è una piccola molecola inibitore della chinasi Src e degli altri membri della famiglia Src, con un'attività più debole nei confronti di Abl. È stato dimostrato che il composto inibisce la crescita cellulare nelle cellule di glioma U251 e riduce l'invasività dello sferoide di glioma impiantato in una matrice di collagene tridimensionale [19,128]. Inoltre, studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che SU6656 aumenta la sensibilità del tumore alle radiazioni. Infatti, promuove l'apoptosi indotta da radiazioni e la distruzione dei vasi sanguigni all'interno del tumore, portando a un ritardo nella crescita dello stesso [129] e suggerendo di considerare l'effetto antitumorale di SU6656 nel trattamento del GBM.

1.4.6. PONATINIB



Ponatinib è stato approvato nel 2012 dalla FDA per il trattamento di pazienti affetti da LMC e Ph+ALL resistenti o intolleranti, come inibitore multi-chinasico di terza generazione contro Bcr-Abl, SRC, EGFR, PDGFR, FGFR e VEGFR [130]. Ponatinib nel 2013 è stato temporaneamente sospeso a causa di gravi effetti collaterali, probabilmente causati dalla pan-attività di questo TKI, ed è stato quindi reintrodotta solo per pazienti selezionati [131]. È stato dimostrato che Ponatinib ha un effetto antitumorale nelle cellule U87 di GBM, riducendo la vitalità cellulare, la migrazione, l'invasione e causando la morte cellulare per apoptosi. Inoltre, è stata osservata una riduzione della crescita tumorale *in vivo*, anche se l'uso di modelli eterotopici limita questo studio. Precedenti evidenze mostrano una differenza critica nell'effetto antitumorale di Ponatinib tra modelli eterotopici e ortotopici [132,133]. Recentemente, è stato segnalato uno studio clinico di fase II su pazienti affetti da GBM resistente al bevacizumab trattati con Ponatinib. L'idea alla base dello studio era cercare di superare la resistenza alla terapia inibendo sia chinasi recettoriali che citoplasmatiche mediante l'uso di Ponatinib. Sfortunatamente, lo studio si è chiuso in anticipo a causa dell'inefficacia del composto [134] (**Tabella 2**). Una possibile spiegazione a ciò è l'incapacità del farmaco di raggiungere il tumore, come si è detto in precedenza [132].

1.4.7. SI221



SI221 è un inibitore selettivo delle SFKs, a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica sintetizzato dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Schenone, dove ho svolto il mio lavoro di tesi sperimentale. SI221 è in grado di ridurre la migrazione delle cellule e di promuovere la morte cellulare nel GBM. Rispetto a PP2, SI221 ha mostrato un effetto citotossico più significativo, una maggiore stabilità metabolica e un migliore potenziale di attraversamento della BEE [115, 135, 136]. Sono stati eseguiti studi di formulazione per aumentarne la solubilità in acqua al fine di migliorare ulteriormente le sue potenzialità [137].

Il composto SI221 è stato scelto tra una vasta libreria di composti a struttura pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica inibitori di Src dopo aver valutato l'attività antiproliferativa su 4 linee cellulari di GBM e su cellule non cancerose (fibroblasti primari della pelle umana) mediante saggio MTS. In effetti, questa molecola ha ridotto significativamente la vitalità delle cellule in tutte le linee cellulari di GBM (U-373MG, U-87MG, T98G e PRT-HU2) e non ha avuto quasi alcun effetto tossico sui fibroblasti, influenzandone leggermente la loro vitalità solo alle massime concentrazioni utilizzate (**Fig. 1**). I valori di IC₅₀ (concentrazione che inibisce del 50% la crescita cellulare) di SI221 sono nel range 12.5-17.9 micromolare sulle 4 linee di GBM. SI221 è risultato molto più attivo del composto di riferimento PP2, che ha analoga struttura pirazolico pirimidinica.

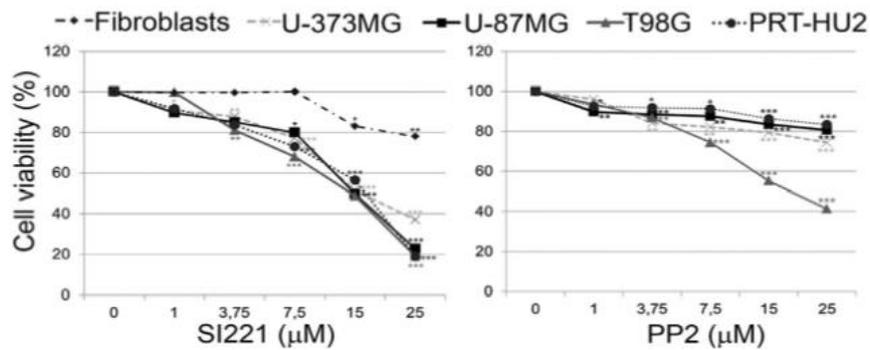


Figura 1: analisi della vitalità cellulare mediante test MTS in fibroblasti cutanei umani primari, linee cellulari U-373MG, U-87MG, T98G e PRT-HU2 72 ore dopo il trattamento con SI221 o PP2 alle concentrazioni indicate. I risultati sono riportati come mezzo di tre esperimenti indipendenti, ciascuno condotto in triplicato, ed espressi come percentuali di vitalità cellulare calcolate rispetto alle cellule di controllo trattate con DMSO.

Per verificare se SI221 fosse effettivamente in grado di inibire le SFK nelle cellule di GBM, è stata valutata l'espressione della forma fosforilata attiva di SFK e Src totale nelle linee cellulari di GBM dopo 72 ore di trattamento con SI221 al suo valore di IC₅₀. Come previsto, la molecola ha causato una forte diminuzione delle fosfo-SFK in tutte le linee cellulari di GBM. Inoltre, è stata analizzata l'espressione delle fosfo-SFK anche nei fibroblasti. La forma attiva di SFK non era rilevabile in queste cellule non tumorali nelle quali SI221 era quasi inefficace, confermando così la specificità di SI221 verso le SFKs in forma fosforilata, che è la forma enzimatica attiva (Fig. 2).

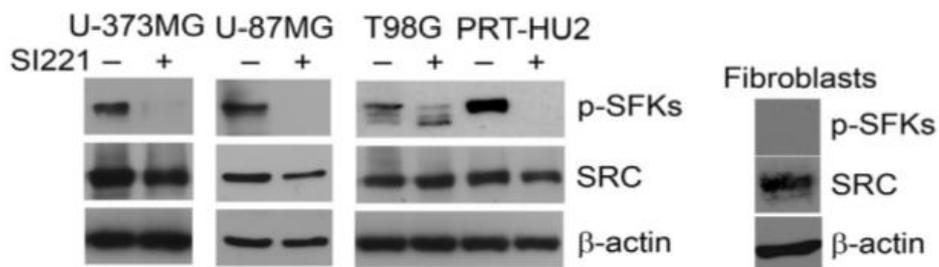


Figura 2: analisi western blotting rappresentativa di fosfo-SFK Tyr419 (p-SFK) e Src totale in linee cellulari di GBM trattate con SI221, ai suoi valori IC₅₀, o DMSO, come controllo, per 72 ore. L'anticorpo

anti-b-actina è stato utilizzato per il controllo del carico. Analisi Western blotting di fosfo-SFK ed espressione totale di SRC nella pelle umana primaria fibroblasti. Per il controllo del carico è stato utilizzato un anticorpo anti-b-actina.

È stata quindi analizzata la capacità di SI221 di esercitare un'inibizione a lungo termine di crescita delle cellule GBM mediante test clonogenico ed è stato osservato che il trattamento con SI221 ha inibito notevolmente la formazione di colonie in tutte le linee cellulari di GBM (**Fig. 3**).

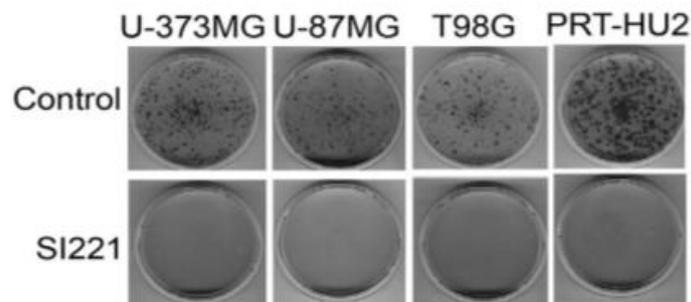


Figura 3: piatti rappresentativi di saggi clonogenici che mostrano l'effetto a lungo termine del trattamento con SI221 su linee cellulari di GBM. le cellule di controllo sono state trattate con solo DMSO.

Per valutare se l'effetto antiproliferativo dell'inibizione di SFK in cellule di GBM era dovuto alla morte cellulare o all'arresto del ciclo cellulare, è stato analizzato il profilo del ciclo cellulare delle linee U-373MG, U-87MG, T98G, PRT-HU2 72 ore dopo il trattamento con SI221 ai suoi valori di IC_{50} . È stato osservato un marcato aumento del picco sub-G1 in tutte le linee cellulari di GBM dopo il trattamento con SI221, che potrebbe essere indicativo di apoptosi. Per confermare la capacità di SI221 di indurre apoptosi nelle linee cellulari di GBM, è stata analizzata l'attività enzimatica della capsasi-3 ed è stata osservato un aumento significativo dell'attività della caspasi-3 in tutte le linee cellulari di GBM 72 ore dopo il trattamento con SI221 ai suoi valori di IC_{50} (**Fig. 4**).

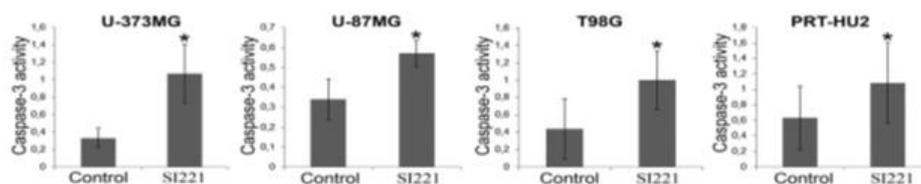


Figura 4: istogrammi che riportano l'attività delle capsasi-3 in linee cellulari di GBM dopo 72 ore di trattamento con SI221, ai suoi valori IC₅₀, o DMSO, come controllo. L'attività della capsasi-3 è espressa come pmol pNA/μg proteina x h. i valori riportati rappresentano le medie e lo standard di deviazioni di tre esperimenti. Le differenze statisticamente significative tra le cellule trattate e quelle di controllo sono state valutate mediante test t di Student e indicate con *: significativo (P<0,05).

Per esaminare l'effetto di inibizione delle SFKs sulla migrazione delle cellule GBM, è stato eseguito uno "Scratch Test". In particolare, dopo aver graffiato gli strati mono cellulari di U-373MG, U-87MG, T98G, PRT-HU2, le cellule sono state trattate con SI221 ai suoi valori di IC₅₀ (come precedentemente calcolato a 72 ore dopo il trattamento) si è valutato la chiusura della "ferita" 24 ore dopo il trattamento. È stato evidenziato che il trattamento con SI221 ha ridotto drasticamente la capacità delle cellule GBM di migrare nel graffio (**Fig. 5**).

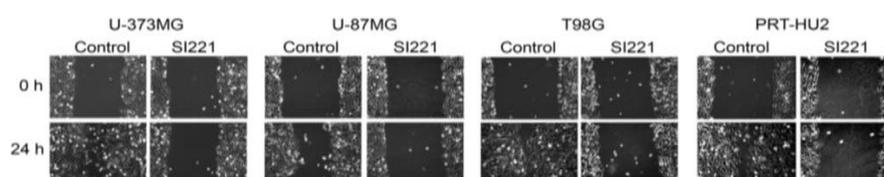
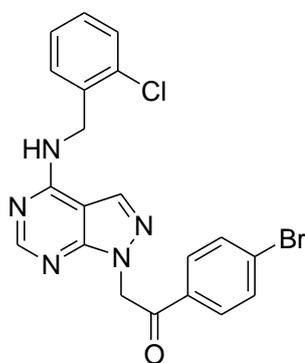


Figura 5: effetto di SI221 sulla migrazione cellulare GBM. Sono mostrate micrografie rappresentative dei "Scratch test" eseguiti su cellule U-373MG, U-87MG, T98G e PRT-HU2. Le micrografie sono state scattate a 0 e 24 ore dopo trattamento con SI221, ai suoi valori di IC₅₀ dopo 72 ore, o DMSO, come controllo.

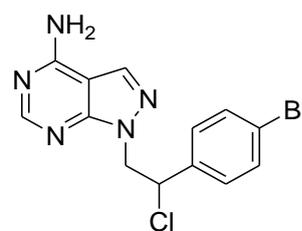
Il gruppo di ricerca ha valutato la capacità di SI221 di attraversare passivamente la BEE, dal momento che la bassa permeabilità di questa barriera rappresenta un grosso ostacolo allo sviluppo dei farmaci per il trattamento di tumori cerebrali [138]. A tal fine, è stato eseguito un

test PAMPA-BBB (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay – Blood Brain Barrier) che ha evidenziato che SI221 ha una buona capacità di attraversare la BEE.

Studi di ADME (Assorbimento Distribuzione Metabolismo Escrezione) hanno mostrato un'alta stabilità metabolica di SI221. Sono stati caratterizzati e quantificati attraverso LC-UV-MS i metaboliti di SI221 che si formano dal metabolismo valutato in microsomi di fegato umano (HLM). I due metaboliti M1 e M2 (uno derivato da una reazione di dechlorurazione ossidativa e l'altro da una reazione di N-dealchilazione), come atteso, sono presenti in basse percentuali (3.1 e 1.6%), ad ulteriore conferma dell'elevata stabilità del composto.



M1 8

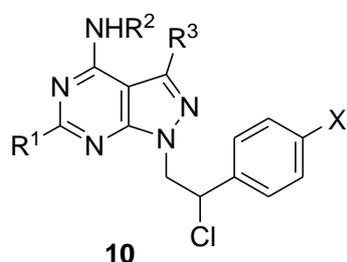


M2 9

Il ruolo centrale di Src nella modulazione di diversi percorsi, che sostengono l'interazione tra infiammazione e ricablaggio metabolico e contribuiscono complessivamente al TME in GBM, dimostra le sue potenzialità come target terapeutico. Sfortunatamente, nonostante i risultati incoraggianti ottenuti in diversi studi preclinici, la maggior parte degli studi clinici condotti finora ha fallito. Oltre alla localizzazione del tumore e alla scarsa permeabilità della BEE, l'eterogeneità intra-tumorale e in particolare la forte interazione tra cellule tumorali e TME sono i fattori che destano più preoccupazione [138]. Per aumentare le possibilità di tradurre con successo i risultati preclinici in terapia sono quindi assolutamente necessari studi per migliorare la permeabilità dei farmaci e per chiarire le basi molecolari e le reti innescate dalla deregolamentazione Src. In particolare, la caratterizzazione della segnalazione Src, può portare all'identificazione di nuovi bersagli farmacologici per interferire con la capacità di Src di sostenere il TME, e quindi migliorare la risposta del tumore alla terapia. Inoltre, l'eterogeneità inter-tumorale nei pazienti con GBM è un altro problema fondamentale che deve essere considerato [139] e che indica la necessità di studi volti a migliorare la stratificazione dei pazienti e di identificare quali pazienti GBM possono effettivamente beneficiare del targeting Src.

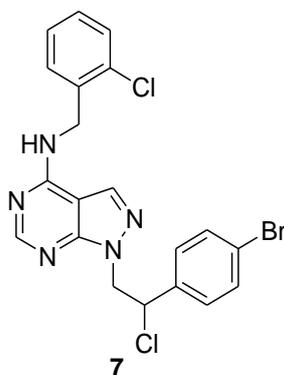
2. PROGETTO

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 sostituite **10**, recanti la catena 2-cloro-2-feniletlica sulla posizione N1, un atomo di idrogeno o anello aromatico sulla posizione C3, diverse ammine alifatiche o aromatiche in posizione C4 e un atomo di idrogeno o sostituenti solforati in posizione C6. In alcuni casi è anche presente un alogeno in posizione *para* sull'anello benzenico della catena in N1. Queste molecole generalmente agiscono come inibitori delle tirosine chinasi citoplasmatiche Src e/o Bcr-Abl [140,141].



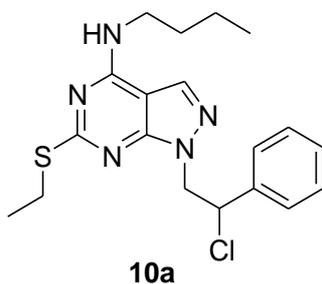
R¹ = H, SCH₃, SC₂H₅, S-cicloesile, S-ciclopentile
NHR² = gruppi amminici alifatici o aromatici
R³ = H o sostituenti aromatici
X = H, F, Cl, Br

Come già riportato nell'introduzione, la molecola SI221 **7**, recante un gruppo 2-clorobenzilamminico in C4 e un bromo in posizione *para* sull'anello benzenico della catena in N1, ha dato risultati soddisfacenti perché è in grado di ridurre la migrazione e di promuovere la morte cellulare in cellule di glioblastoma andando ad agire su Src. Inoltre, si è notato che la molecola presenta una maggiore stabilità metabolica e miglior attraversamento della BEE rispetto alla molecola PP2 noto inibitore delle SFKs [137].

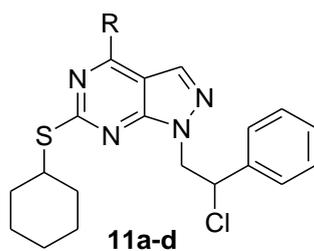


Considerando i risultati ottenuti con la molecola SI221 **7**, si è pensato di andare a modificare i sostituenti sullo scheletro pirazolo-pirimidinico in modo da ampliare gli studi di relazione struttura-attività (SAR) e identificare nuove molecole attive sul GBM.

A questo scopo, visto l'iperattivazione di Src nel GBM, si è partiti da molecole di precedente sintesi attive come inibitori di Src e non ancora valutate per il trattamento del GBM. Tra i vari composti, il derivato **10a**, che presenta un gruppo tioetilico in C6 e una catena butilamminica in C4 è sembrato interessante per progettare nuovi analoghi. **10a** ha la capacità di interferire con la fosforilazione di Src, con una K_i di 0.6 μM , e presenta un'attività antiproliferativa in diverse linee cellulari tumorali, quali la linea cellulare A431 di carcinoma epidermoide e la linea 8701-BC di cancro al seno, con un' IC_{50} di 40.4 e 39 μM , rispettivamente. Considerando il rapporto tra Src fosforilate e non fosforilate, si passa da un 51% di Src fosforilate ad un 21% dopo trattamento con **10a** [142].



Sulla base degli ottimi risultati ottenuti, si è pensato di sintetizzare una nuova serie di composti recanti uno scaffold pirazolo-pirimidinico e aventi diversi sostituenti nelle posizioni C4 e C6. In particolare, si è inserito il gruppo tiocicloesilico in C6, in modo da esplorare l'effetto di altre catene solforate in questa posizione dell'anello, e diverse ammine alifatiche in C4. Oggetto della mia tesi sperimentale di laurea è quindi la sintesi dei composti **11a-d**.



11a: R = NHC₃H₇

11b: R = NHC₄H₉

11c: R = N(C₂H₅)₂

11d: R = NHCH₂C₆H₅

DISCUSSIONE

3.1 Chimica

Il composto di partenza per la sintesi dei derivati **11a-d** è l'1-fenil-2-idrazino etanolo **12**, ottenuto per reazione dell'idrazina monoidrata con ossido di stirene a 100 °C.

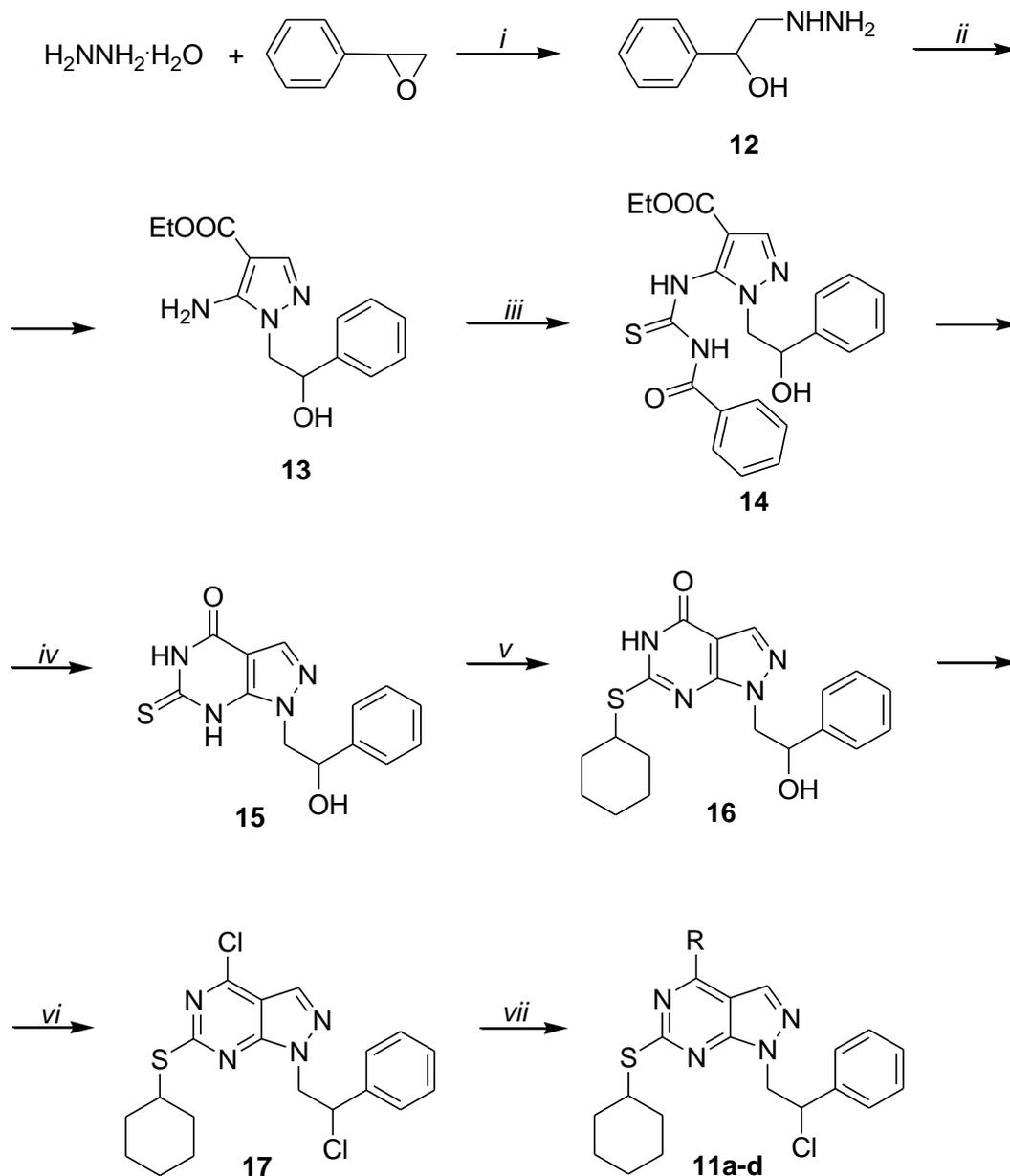
Trattando quindi l'1-fenil-2-idrazino etanolo **12** con etossimetilencianoacetato di etile a 70-80 °C in toluene anidro per 8h, si ottiene il 5-ammino-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **13**.

Quest'ultimo, per reazione con benzoilisotiocianato in tetraidrofurano (THF) anidro, porta alla formazione del 5-[[benzoilammino]carbonotioil]ammino}-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **14**, che viene successivamente trattato con idrossido di sodio. La successiva precipitazione con acido acetico glaciale permette di ottenere il derivato ciclizzato 1-(2-idrossi-2-feniletil)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **15** con ottima resa.

Il composto **15** viene alchilato sull'atomo di S legato al C in posizione 6 utilizzando bromocicloesano e K₂CO₃ anidro in *N,N*-dimetilformamide (DMF) anidra. Il 6-(tiocicloesil)-1-(2-idrossi-2-feniletil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-one **16** viene quindi clorurato con il complesso di Vilsmeier (POCl₃, DMF, 1:1,) in CHCl₃ a riflusso per 8h per ottenere la 4-cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(tiocicloesil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina **17**. Il prodotto grezzo viene purificato con buona resa con colonna cromatografica su Florisil.

Infine, la reazione tra il prodotto **17** ed un eccesso di varie ammine alifatiche in toluene anidro, a temperatura ambiente per un tempo di 48h porta alla formazione dei derivati dell'1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(tiocicloesil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*] pirimidina **11a-d** (Schema 1).

Schema I: sintesi dei composti 11a-d.



- 11a:** R = NHC_3H_7
11b: R = NHC_4H_9
11c: R = $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
11d: R = $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

^a **Reagenti e condizioni:** (i) 100 °C, 15 min; (ii) (etossimetilene)cianoacetato di etile, toluene anidro, 70-80 °C, 8h; (iii) benzoil isotiocianato, THF anidro, refluxo, 12h; (iv) NaOH 2N, 100 °C, 10 min, poi AcOH; (v) bromocicloesano, K_2CO_3 , DMF, 80 °C; (vi) POCl_3/DMF , CHCl_3 , refluxo, 8h; (vii) ammine alifatiche, toluene anidro, t.a., 48h.

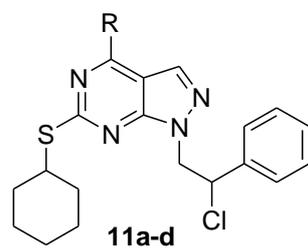
3.2 Biologia

I composti sono stati inviati al Dott. Maga che con i suoi collaboratori dell'Istituto di Genetica Molecolare del CNR-Pavia, ha effettuato dei test enzimatici su Src e Abl. Vista l'attività che molti membri della libreria **10** presentano verso quest'ultima chinasi e il suo coinvolgimento nel GBM, si è pensato di estendere i test anche a Abl

Test enzimatico su Src isolato/Abl: il meccanismo d'inibizione dell'attività chinasica è stato studiato usando un test "cell free" che utilizza Src/Abl ricombinante. L'attività è stata misurata in un test di binding utilizzando un peptide substrato specifico per Src/Abl e [γ - ^{32}P]ATP. Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato e i valori medi sono stati usati per l'interpolazione. Le curve d'inibizione sono state ottenute con il programma GraphPad Prism.

I valori d'inibizione sono riportati in **Tabella 3**.

Tabella 3. Test d'inibizione enzimatica dei composti **11a-d** su Src/Abl.



Composto	R	Enzima Src (μM)	Enzima Abl (μM)
11a	NHC_3H_7	0.67	1.10
11b	NHC_4H_9	0.53	1.20
11c	$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	NA	NA
11d	$\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	1	NA

NA = Non Attivo

4. RISULTATI E CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi sperimentale ha portato alla sintesi di una piccola libreria di composti **11a-d**, che sono stati testati in un saggio enzimatico preliminare sulle chinasi Src e Abl.

Tutte le molecole hanno mostrato una certa attività inibitoria nei confronti di Src ad eccezione di **11c**. Confrontando le strutture dei quattro derivati possiamo notare che le molecole **11a,11b** e **11d** presentano un'ammina secondaria sull'N in posizione C4, mentre la molecola **11c** presenta un'ammina terziaria nella stessa posizione. Si può quindi ipotizzare che l'attività sull'enzima Src sia legata alla presenza dell'ammina secondaria in C4. Questo trova riscontro dal fatto che studi di modeling su molecole analoghe hanno messo in luce che l'idrogeno del gruppo amminico in C4 è coinvolto nella formazione di un legame idrogeno a livello della tasca catalitica dell'enzima.

Per quanto riguarda Abl invece, soltanto le molecole **11a,b** sono attive. I migliori sostituenti in C4 per l'attività verso questa chinasi sembrano essere quindi corte catene amminiche lineari. Nel complesso questo lavoro ci ha permesso di identificare i derivati **11a** e **11b** che sono caratterizzati da una buona attività nei confronti di Src e una discreta attività su Abl e quindi meritano ulteriori approfondimenti e sviluppi. Sarebbe quindi interessante testare questi composti su cellule di glioblastoma per valutare la loro attività in un modello *in vitro* di questo tumore.

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Chimica

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

Gli spettri IR sono stati registrati in KBr o CHCl_3 , 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 δ (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, m = multipletto, s all. = s allargato. Gli spettri sono stati registrati in CDCl_3 o in DMSO-d_6 .

Tutti i composti sono stati analizzati per C, H, N con un analizzatore elementare Carlo Erba 1106; i risultati analitici sono compresi nell'intervallo $\pm 0.4\%$ rispetto ai valori teorici.

Preparazione dell'1-fenil-2-idrazino etanolo 12

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 in leggero riflusso.

Terminata l'aggiunta, si agita ancora 15 minuti e si allontana sottovuoto 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-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **13**

Ad una soluzione di etossimetilencianoacetato di etile (3.38 g, 20 mmoli) in toluene anidro (20 mL) viene aggiunto 1-fenil-2-idrazino etanolo **12** (3.04 g, 20 mmoli).

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

Si evapora il solvente per ridurre il volume di circa metà e si lascia cristallizzare a temperatura ambiente.

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

P.f.: 136-137 °C

Resa: 70%

Analisi elementare per C₁₄H₁₇N₃O₃

P.M. 275.30

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

IR (CHCl₃): 3470-3330 (NH₂), 3300-3000 (OH), 1685 (C=O) cm⁻¹.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.53 (s all., 1H, OH, scompare con D₂O), 3.92-4.20 (m, 2H, CH₂N), 4.25 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂O), 5.02-5.13 (m, 1H, CHO), 5.30 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.23-7.42 (m, 5H Ar), 7.58 (s, 1H, H-3 pirazolo) ppm.

Preparazione del 5-[[[(benzoilammino)carbonotioil]ammino]-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile 14

Ad una sospensione di 5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **14** (2.75 g, 10 mmoli) in THF anidro (20 mL) si aggiunge in un'unica porzione benzoil isotiocianato (1.7 g, 11 mmoli).

Si mantiene a refluxo per 12h e successivamente si evapora il solvente sottovuoto.

Il residuo da evaporazione viene ripreso con etere dietilico: precipita un solido che viene filtrato e ricristallizzato da etanolo assoluto.

P.f.: 170-172 °C

Resa: 93%

Analisi elementare per C₂₂H₂₂N₄O₄S

P.M. 438.50

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

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

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.97-4.20 (m, 5H, 2CH₂ + OH, 1H scompare con D₂O), 4.58-4.68 (m, 1H, CHO), 7.05-7.98 (m, 10H, Ar), 8.02 (s, 1H, H-3 pirazolo), 8.70 (s, 1H, NH, scompare con D₂O), 12.05 (s, 1H, NH, scompare con D₂O) ppm.

Preparazione dell'1-(2-feniletil-2-idrossi)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-one 15

Il composto 5-[[benzoiilammino]carbonioil]ammino}-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1H-pirazolo-4-carbossilato di etile **14** (4.38 g, 10 mmoli) viene sciolto in NaOH 2N (40 mL) e agitato su bagnomaria bollente per 10 minuti.

La soluzione viene diluita con acqua (40 mL), quindi filtrata 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 C₁₃H₁₂N₄O₂S

P.M. 288.32

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	54.15	4.19	19.43	11.12
Trovato	54.28	4.27	19.70	11.03

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

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 4.15-4.72 (m, 2H, CH₂N), 4.85-5.00 (m, 1H, CHO), 5.66 (s all., 1H, OH, scompare con D₂O), 7.20-7.51 (m, 5H Ar), 8.02 (s, 1H, H-3 pirazolo), 12.20 (s, 1H, NH, scompare con D₂O), 13.40 (s, 1H, NH, scompare con D₂O) ppm.

Preparazione del 6-(tiocicloesil)-1-(2-idrossi-2-fenilettil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5*H*)-one 16

Una miscela contenente: 1-(2-fenilettil-2-idrossi)-6-tioxo-1,5,6,7-tetraidro-4*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-one **15** (2.88 g, 10 mmol), bromocicloesano (1.70 g, 10.44 mmol) e K₂CO₃ (1.38 g, 10 mmol) in DMF anidra (10 mL) viene agitata a 80 °C per 15h.

A fine reazione la miscela viene versata in H₂O fredda, il precipitato viene filtrato, lavato con H₂O e ricristallizzato con EtOH assoluto per ottenere il composto **16** come solido bianco.

P.f.: 226-227 °C

Resa: 48%

Analisi elementare per C₁₉H₂₂N₄O₂S

P.M. 370.47

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	61.60	5.99	15.12	8.66
Trovato	61.56	6.05	15.11	8.32

IR (KBr): 3315-2850 (NH+OH), 1704 (CO) cm⁻¹.

¹HNMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ 1.30-1.85 (m, 10H, 5CH₂ cicloesile), 3.89-3.99 (m, 1H, CHS), 4.20-4.39 (m, 2H, CH₂N), 5.00-5.22 (m, 1H, CHOH), 5.60 (d, 1H, OH scompare con D₂O), 7.10-7.40 (m, 5H, Ar), 7.90 (s, 1H, H-3 pirazolo), 12.22 (s all, 1H, NH scompare con D₂O) ppm.

Preparazione della 4-cloro-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(tiocicloesil)-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina **17**

Il complesso di Vilsmeier, precedentemente preparato con POCl₃ (1.53 g, 10 mmol) e DMF anidro (0.73 g, 10 mmol), viene aggiunto ad una sospensione contenente il 6-(tiocicloesil)-1-(2-idrossi-2-fenilettil)-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4(5H)-one **16** (0.37 g, 1 mmol) in CHCl₃ (50 mL).

La miscela viene lasciata a riflusso per 8h. A fine reazione la soluzione viene lavata con H₂O (2 x 20 mL), essiccata su MgSO₄, filtrata e concentrata a pressione ridotta.

L'olio grezzo, residuo dell'evaporazione, viene purificato in colonna cromatografica (Florisil, 100-200 mesh) usando Et₂O come eluente, per ottenere il prodotto puro **17** come solido bianco.

P.f.: 77-78 °C

Resa: 86%

Analisi elementare per C₁₉H₂₀N₄Cl₂S

P.M. 407.36

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

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.32-1.82 (m, 10H, 5CH₂ cicloesile), 3.87-3.95 (m, 1H, CHS), 4.58-4.62 e 4.64-4.84 (2m, 2H, CH₂N), 5.25-5.35 (m, 1H, CHCl), 7.21-7.38 (m, 5H, Ar), 7.72 (s, 1H, H-3 pirazolo) ppm.

Preparazione dei derivati 1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(tiocicloesil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidinici 11a-d

L'ammina appropriata (40 mmol) viene aggiunta ad una soluzione contenente il 4-cloro-1-(2-cloro-2-feniletil)-6-(tiocicloesil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidina **17** (4.07 g, 10 mmol) in toluene anidro (10 mL) e mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 48h.

La fase organica viene lavata con H₂O (2 x 10 mL), essiccata su MgSO₄, filtrata e concentrata a pressione ridotta.

Il residuo dell'evaporazione è un olio grezzo che viene cristallizzato utilizzando una miscela 1:1 di Et₂O/etere di petrolio (EP) (T di ebollizione 40-60 °C).

1-(2-Cloro-2-feniletil)-6-(tiocicloesil)-*N*-propil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina **11a**

P.f.: 115-117 °C

Resa: 53%

Analisi elementare per C₂₂H₂₈ClN₅S

P.M. 430.01

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	61.45	6.56	16.29	7.46
Trovato	61.74	6.35	16.32	6.82

IR (KBr): 3240 (NH) cm⁻¹.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.23-1.84 (m, 10H, 5CH₂ cicloesile), 2.04-2.13 (m, 2H, CH₂CH₃), 3.47 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂NH), 3.69-4.06 (m, 1H,

SCH), 4.53-4.88 (m, 2H, NCH₂), 5.13 (s all, 1H, NH, scompare con D₂O), 5.40-5.53 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, CHCl), 7.16-7.48 (m, 5H Ar), 7.69 (s, 1H, H-3 pirazolo) ppm.

***N*-Butil-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(tiocicloesil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 11b**

P.f.: 115-116 °C

Resa: 58%

Analisi elementare per C₂₃H₃₀ClN₅S

P.M. 444.04

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	62.21	6.81	15.77	7.22
Trovato	62.47	7.03	15.86	7.10

IR (KBr): 3243 (NH) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 1.36-1.61 (m, 10H, 5CH₂ cicloesile), 1.76-1.78 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.08-2.12 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3.50 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂NH), 3.75 (m, 1H, SCH), 4.65-4.70 e 4.76-4.82 (2m, 2H, NCH₂), 5.13 (s all, 1H, NH, scompare con D₂O), 5.46 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, CHCl), 7.24-7.43 (m, 5H, Ar), 7.68 (s, 1H, H-3 pirazolo) ppm.

1-(2-Cloro-2-fenilettil)-6-(tiocicloesil)-*N,N*-dietil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina

11c

P.f.: 84-86 °C

Resa: 49%

Analisi elementare per C₂₃H₃₀ClN₅S

P.M. 444.04

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	62.21	6.81	15.77	7.22
Trovato	62.56	6.78	15.38	6.78

IR (KBr): 3241 (NH) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.35-1.63 (m, 10H, 5 CH_2 cicloesile), 1.98 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, 2 CH_3), 3.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, 2 CH_2NH), 3.74 (m, 1H, SCH), 4.63-4.68 e 4.77-4.80 (2m, 2H, NCH_2), 5.44-5.46 (m, 1H, CHCl), 7.24-7.43 (m, 5H, Ar), 7.88 (s, 1H, H-3 pirazolo) ppm.

***N*-Benzil-1-(2-cloro-2-fenilettil)-6-(tiocicloesil)-*N*-fenil-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-4-ammina 11d**

P.f.: 124-126 $^\circ\text{C}$

Resa: 47%

Analisi elementare per $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_5\text{S}$

P.M. 478.05

	C%	H%	N%	S%
Calcolato	65.32	5.90	14.65	6.71
Trovato	65.06	6.10	14.70	6.44

IR (KBr): 3243 (NH) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.32-1.61 (m, 10H, 5 CH_2 cicloesile), 3.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2NH), 3.73 (m, 1H, SCH), 4.60-4.65 e 4.68-4.72 (2m, 2H, NCH_2), 5.21-5.24 (m, 1H, CHCl), 7.17-7.23 e 7.27-7.39 (2m, 10H, Ar), 7.71 (s, 1H, H-3 pirazolo) ppm.

BIBLIOGRAFIA

1. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 987-996, 507 doi:10.1056/NEJMoa043330;
2. Network, C.G.A.R. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **2008**, *455*, 1061-1068, doi:10.1038/nature07385;
3. Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P., et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98-110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020;
4. Blume-Jensen, P.; Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **2001**, *411*, 355-365, doi:10.1038/35077225;
5. Schiffer, D.; Annovazzi, L.; Casalone, C.; Corona, C.; Mellai, M. Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers (Basel)* **2018**, *11*, doi:10.3390/cancers11010005;
6. Chiarugi, P.; Cirri, P. Metabolic exchanges within tumor microenvironment. *Cancer Lett* **2016**, *380*, 272-280, doi:10.1016/j.canlet.2015.10.027;
7. Dunn, G.P.; Rinne, M.L.; Wykosky, J.; Genovese, G.; Quayle, S.N.; Dunn, I.F.; Agarwalla, P.K.; Chheda, M.G.; Campos, B.; Wang, A., et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* **2012**, *26*, 756-784, doi:10.1101/gad.187922.112;
8. Bao, S.; Wu, Q.; McLendon, R.E.; Hao, Y.; Shi, Q.; Hjelmeland, A.B.; Dewhirst, M.W.; Bigner, D.D.; Rich, J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **2006**, *444*, 756-760, doi:10.1038/nature05236;
9. Short, S.C.; Martindale, C.; Bourne, S.; Brand, G.; Woodcock, M.; Johnston, P. DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes. *Neuro Oncol* **2007**, *9*, 404-411, doi:10.1215/15228517-2007-030;
10. Yeung, Y.T.; McDonald, K.L.; Grewal, T.; Munoz, L. Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy. *Br J Pharmacol* **2013**, *168*, 591-606, doi:10.1111/bph.12008;
11. Zhou, W.; Wahl, D.R. Metabolic abnormalities in glioblastoma and metabolic strategies to overcome treatment resistance. *Cancers* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11091231;
12. Thorne, A.H.; Zanca, C.; Furnari, F. Epidermal growth factor receptor targeting and 536 challenges in glioblastoma. *Neuro Oncol* **2016**, *18*, 914-918, doi:10.1093/neuonc/nov319;
13. Rous, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* **1911**, *13*, 397-411, doi:10.1084/jem.13.4.397;
14. Martin, G.S. Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed 540 state. *Nature* **1970**, *227*, 1021-1023, doi:10.1038/2271021a0;

15. Stehelin, D.; Varmus, H.E.; Bishop, J.M.; Vogt, P.K. DNA related to the transforming gene(s) 542 of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **1976**, *260*, 170-173, 543 doi:10.1038/260170a0;
16. Sicheri, F.; Kuriyan, J. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* **1997**, *7*, 545 777-785, doi:10.1016/s0959-440x(97)80146-7;
17. Sen, B.; Johnson, F.M. Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct* **2011**, *2011*, 865819, doi:10.1155/2011/865819;
18. Bjorge, J.D.; Jakymiw, A.; Fujita, D.J. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* **2000**, *19*, 5620-5635, doi:10.1038/sj.onc.1203923;
19. Ahluwalia, M.S.; de Groot, J.; Liu, W.M.; Gladson, C.L. Targeting SRC in glioblastoma tumors and brain metastases: rationale and preclinical studies. *Cancer Lett* **2010**, *298*, 139-149, doi:10.1016/j.canlet.2010.08.014;
20. Stettner, M.R.; Wang, W.; Nabors, L.B.; Bharara, S.; Flynn, D.C.; Grammer, J.R.; Gillespie, G.Y.; Gladson, C.L. Lyn kinase activity is the predominant cellular SRC kinase activity in glioblastoma tumor cells. *Cancer Res* **2005**, *65*, 5535-5543, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3688;
21. Du, J.; Bernasconi, P.; Clauser, K.R.; Mani, D.R.; Finn, S.P.; Beroukhim, R.; Burns, M.; Julian, B.; Peng, X.P.; Hieronymus, H., et al. Bead-based profiling of tyrosine kinase phosphorylation identifies SRC as a potential target for glioblastoma therapy. *Nat Biotechnol* **2009**, *27*, 77-83, doi:10.1038/nbt.1513;
22. Ahmed, A.U.; Auffinger, B.; Lesniak, M.S. Understanding glioma stem cells: rationale, clinical relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Neurother* **2013**, *13*, 545-555, doi:10.1586/ern.13.42;
23. Atkinson, G.P.; Nozell, S.E.; Benveniste, E.T. NF-kappaB and STAT3 signaling in glioma: targets for future therapies. *Expert Rev Neurother* **2010**, *10*, 575-586, doi:10.1586/ern.10.21;
24. Ji, Z.; He, L.; Regev, A.; Struhl, K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF-kB, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116*, 9453-9462, doi:10.1073/pnas.1821068116;
25. Gupta, K.; Burns, T.C. Radiation-Induced Alterations in the Recurrent Glioblastoma Microenvironment: Therapeutic Implications. *Front Oncol* **2018**, *8*, 503, doi:10.3389/fonc.2018.00503;
26. Matias, D.; Balça-Silva, J.; da Graça, G.C.; Wanjiru, C.M.; Macharia, L.W.; Nascimento, C.P.; Roque, N.R.; Coelho-Aguiar, J.M.; Pereira, C.M.; Dos Santos, M.F., et al. Microglia/Astrocytes-Glioblastoma Crosstalk: Crucial Molecular Mechanisms and Microenvironmental Factors. *Front Cell Neurosci* **2018**, *12*, 235, doi:10.3389/fncel.2018.00235;
27. Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436-444, doi:10.1038/nature07205;
28. Solinas, G.; Marchesi, F.; Garlanda, C.; Mantovani, A.; Allavena, P. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **2010**, *29*, 243-248, doi:10.1007/s10555-010-9227-2;
29. Persano, L.; Rampazzo, E.; Basso, G.; Viola, G. Glioblastoma cancer stem cells: role of the microenvironment and therapeutic targeting. *Biochem Pharmacol* **2013**, *85*, 612-622, doi:10.1016/j.bcp.2012.10.001;
30. Dalerba, P.; Cho, R.W.; Clarke, M.F. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* **2007**, *58*, 267-284, doi:10.1146/annurev.med.58.062105.204854;

31. Da Ros, M.; De Gregorio, V.; Iorio, A.L.; Giunti, L.; Guidi, M.; de Martino, M.; Genitori, L.; Sardi, I. Glioblastoma Chemoresistance: The Double Play by Microenvironment and Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19102879;
32. Albulescu, R.; Codrici, E.; Popescu, I.D.; Mihai, S.; Necula, L.G.; Petrescu, D.; Teodoru, M.; Tanase, C.P. Cytokine patterns in brain tumour progression. *Mediators Inflamm* **2013**, *2013*, 979748, doi:10.1155/2013/979748;
33. Fianco, G.; Mongiardi, M.P.; Levi, A.; De Luca, T.; Desideri, M.; Trisciuglio, D.; Del Bufalo, D.; Cinà, I.; Di Benedetto, A.; Mottolese, M., et al. Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. *Elife* **2017**, *6*, doi:10.7554/eLife.22593;
34. Wheeler, D.L.; Iida, M.; Dunn, E.F. The role of Src in solid tumors. *Oncologist* **2009**, *14*, 667-678, doi:10.1634/theoncologist.2009-0009;
35. Gladson, C.L.; Prayson, R.A.; Liu, W.M. The pathobiology of glioma tumors. *Annu Rev Pathol* **2010**, *5*, 33-50, doi:10.1146/annurev-pathol-121808-102109;
36. Jinka, R.; Kapoor, R.; Sistla, P.G.; Raj, T.A.; Pande, G. Alterations in Cell-Extracellular Matrix Interactions during Progression of Cancers. *Int J Cell Biol* **2012**, *2012*, 219196, doi:10.1155/2012/219196;
37. Liu, S.T.; Pham, H.; Pandol, S.J.; Ptasznik, A. Src as the link between inflammation and cancer. *Front Physiol* **2013**, *4*, 416, doi:10.3389/fphys.2013.00416;
38. Zachary, I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* **2003**, *31*, 1171-1177, doi:10.1042/bst0311171;
39. Korade-Mirnic, Z.; Corey, S.J. Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J Leukoc Biol* **2000**, *68*, 603-613;
40. Turkson, J.; Bowman, T.; Garcia, R.; Caldenhoven, E.; De Groot, R.P.; Jove, R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* **1998**, *18*, 2545-2552, doi:10.1128/mcb.18.5.2545;
41. Yu, H.; Pardoll, D.; Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 798-809, doi:10.1038/nrc2734;
42. Ancrile, B.; Lim, K.H.; Counter, C.M. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev* **2007**, *21*, 1714-1719, doi:10.1101/gad.1549407;
43. Sparmann, A.; Bar-Sagi, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 447-458, doi:10.1016/j.ccr.2004.09.028;
44. Inda, M.M.; Bonavia, R.; Mukasa, A.; Narita, Y.; Sah, D.W.; Vandenberg, S.; Brennan, C.; Johns, T.G.; Bachoo, R.; Hadwiger, P., et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* **2010**, *24*, 1731-1745, doi:10.1101/gad.1890510;
45. Bonavia, R.; Inda, M.M.; Vandenberg, S.; Cheng, S.Y.; Nagane, M.; Hadwiger, P.; Tan, P.; Sah, D.W.; Cavenee, W.K.; Furnari, F.B. EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. *Oncogene* **2012**, *31*, 4054-4066, doi:10.1038/onc.2011.563;
46. Tanaka, K.; Babic, I.; Nathanson, D.; Akhavan, D.; Guo, D.; Gini, B.; Dang, J.; Zhu, S.; Yang, H.; De Jesus, J., et al. Oncogenic EGFR signaling activates an mTORC2-NF- κ B pathway that promotes chemotherapy resistance. *Cancer Discov* **2011**, *1*, 524-538, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0124;

47. Puliappadamba, V.T.; Chakraborty, S.; Chauncey, S.S.; Li, L.; Hatanpaa, K.J.; Mickey, B.; Noorani, S.; Shu, H.K.; Burma, S.; Boothman, D.A., et al. Opposing effect of EGFRWT on EGFRvIII-mediated NF- κ B activation with RIP1 as a cell death switch. *Cell Rep* **2013**, *4*, 764-775, doi:10.1016/j.celrep.2013.07.025;
48. Fianco, G.; Contadini, C.; Ferri, A.; Cirotti, C.; Stagni, V.; Barilà, D. Caspase-8: A Novel Target to Overcome Resistance to Chemotherapy in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19123798;
49. Fianco, G.; Cenci, C.; Barilà, D. Caspase-8 expression and its Src-dependent phosphorylation on Tyr380 promote cancer cell neoplastic transformation and resistance to anoikis. *Exp Cell Res* **2016**, *347*, 114-122, doi:10.1016/j.yexcr.2016.07.013;
50. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **1956**, *124*, 269-270;
51. DeBerardinis, R.J.; Mancuso, A.; Daikhin, E.; Nissim, I.; Yudkoff, M.; Wehrli, S.; Thompson, C.B. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci* **2007**, *104*, 19345-19350, doi:10.1073/pnas.0709747104;
52. De la Cruz-López, K.G.; Castro-Muñoz, L.J.; Reyes-Hernández, D.O.; García-Carrancá, A.; Manzo-Merino, J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* **2019**, *9*, 1143, doi:10.3389/fonc.2019.01143;
53. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029-1033, doi:10.1126/science.1160809;
54. Charles, N.A.; Holland, E.C.; Gilbertson, R.; Glass, R.; Kettenmann, H. The brain tumor microenvironment. *Glia* **2012**, *60*, 502-514, doi:10.1002/glia.21264;
55. Baumann, F.; Leukel, P.; Doerfelt, A.; Beier, C.P.; Dettmer, K.; Oefner, P.J.; Kastenberger, M.; Kreutz, M.; Nickl-Jockschat, T.; Bogdahn, U., et al. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol* **2009**, *11*, 368-380, doi:10.1215/15228517-2008-106;
56. Colen, C.B.; Shen, Y.; Ghoddoussi, F.; Yu, P.; Francis, T.B.; Koch, B.J.; Monterey, M.D.; Galloway, M.P.; Sloan, A.E.; Mathupala, S.P. Metabolic targeting of lactate efflux by malignant glioma inhibits invasiveness and induces necrosis: an in vivo study. *Neoplasia* **2011**, *13*, 620-632, doi:10.1593/neo.11134;
57. Bosc, C.; Selak, M.A.; Sarry, J.E. Resistance Is Futile: Targeting Mitochondrial Energetics and Metabolism to Overcome Drug Resistance in Cancer Treatment. *Cell Metab* **2017**, *26*, 705-707, doi:10.1016/j.cmet.2017.10.013;
58. Viale, A.; Pettazoni, P.; Lyssiotis, C.A.; Ying, H.; Sánchez, N.; Marchesini, M.; Carugo, A.; Green, T.; Seth, S.; Giuliani, V., et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **2014**, *514*, 628-632, doi:10.1038/nature13611;
59. Shibao, S.; Minami, N.; Koike, N.; Fukui, N.; Yoshida, K.; Saya, H.; Sampetean, O. Metabolic heterogeneity and plasticity of glioma stem cells in a mouse glioblastoma model. *Neuro Oncol* **2018**, *20*, 343-354, doi:10.1093/neuonc/nox170;
60. Naguib, A.; Mathew, G.; Reczek, C.R.; Watrud, K.; Ambrico, A.; Herzka, T.; Salas, I.C.; Lee, M.F.; El-Amine, N.; Zheng, W., et al. Mitochondrial Complex I Inhibitors Expose a Vulnerability for Selective Killing of Pten-Null Cells. *Cell Rep* **2018**, *23*, 58-67, 672 doi:10.1016/j.celrep.2018.03.032;

61. Molina, J.R.; Sun, Y.; Protopopova, M.; Gera, S.; Bandi, M.; Bristow, C.; McAfoos, T.; Morlacchi, P.; Ackroyd, J.; Agip, A.A., et al. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nat Med* **2018**, *24*, 1036-1046, doi:10.1038/s41591-018-0052-4;
62. Shi, Y.; Lim, S.K.; Liang, Q.; Iyer, S.V.; Wang, H.Y.; Wang, Z.; Xie, X.; Sun, D.; Chen, Y.J.; Tabar, V., et al. Gboxin is an oxidative phosphorylation inhibitor that targets glioblastoma. *Nature* **2019**, *567*, 341-346, doi:10.1038/s41586-019-0993-x;
63. Wahl, D.R.; Dresser, J.; Wilder-Romans, K.; Parsels, J.D.; Zhao, S.G.; Davis, M.; Zhao, L.; Kachman, M.; Wernisch, S.; Burant, C.F., et al. Glioblastoma Therapy Can Be Augmented by Targeting IDH1-Mediated NADPH Biosynthesis. *Cancer Res* **2017**, *77*, 960-970, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2008;
64. Ye, H.; Huang, H.; Cao, F.; Chen, M.; Zheng, X.; Zhan, R. HSPB1 Enhances SIRT2-Mediated G6PD Activation and Promotes Glioma Cell Proliferation. *PLoS One* **2016**, *11*, e0164285, doi:10.1371/journal.pone.0164285;
65. Ahmad, F.; Dixit, D.; Sharma, V.; Kumar, A.; Joshi, S.D.; Sarkar, C.; Sen, E. Nrf2-driven TERT regulates pentose phosphate pathway in glioblastoma. *Cell Death Dis* **2016**, *7*, e2213, doi:10.1038/cddis.2016.117;
66. Colwell, N.; Larion, M.; Giles, A.J.; Seldomridge, A.N.; Sizdahkhani, S.; Gilbert, M.R.; Park, D.M. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro Oncol* **2017**, *19*, 887-896, doi:10.1093/neuonc/now258;
67. Kathagen, A.; Schulte, A.; Balcke, G.; Phillips, H.S.; Martens, T.; Matschke, J.; Günther, H.S.; Soriano, R.; Modrusan, Z.; Sandmann, T., et al. Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem-like cells. *Acta Neuropathol* **2013**, *126*, 763-780, doi:10.1007/s00401-013-1173-y;
68. Kathagen-Buhmann, A.; Schulte, A.; Weller, J.; Holz, M.; Herold-Mende, C.; Glass, R.; Lamszus, K. Glycolysis and the pentose phosphate pathway are differentially associated with the dichotomous regulation of glioblastoma cell migration versus proliferation. *Neuro Oncol* **2016**, *18*, 1219-1229, doi:10.1093/neuonc/nov024;
69. Velpula, K.K.; Bhasin, A.; Asuthkar, S.; Tsung, A.J. Combined targeting of PDK1 and EGFR triggers regression of glioblastoma by reversing the Warburg effect. *Cancer Res* **2013**, *73*, 7277-7289, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1868;
70. Liu, R.; Li, W.; Tao, B.; Wang, X.; Yang, Z.; Zhang, Y.; Wang, C.; Gao, H.; Liang, J.; Yang, W. Tyrosine phosphorylation activates 6-phosphogluconate dehydrogenase and promotes tumor growth and radiation resistance. *Nat Commun* **2019**, *10*, 991, doi:10.1038/s41467-019-08921-8;
71. Humphrey, S.J.; James, D.E.; Mann, M. Protein Phosphorylation: A Major Switch Mechanism for Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* **2015**, *26*, 676-687, doi:10.1016/j.tem.2015.09.013;
72. Zhang, J.; Wang, S.; Jiang, B.; Huang, L.; Ji, Z.; Li, X.; Zhou, H.; Han, A.; Chen, A.; Wu, Y., et al. c-Src phosphorylation and activation of hexokinase promotes tumorigenesis and metastasis. *Nat Commun* **2017**, *8*, 13732, doi:10.1038/ncomms13732;
73. Rajas, F.; Gautier-Stein, A.; Mithieux, G. Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism. *Metabolites* **2019**, *9*, doi:10.3390/metabo9120282;

74. Flier, J.S.; Mueckler, M.M.; Usher, P.; Lodish, H.F. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* **1987**, *235*, 1492-1495, doi:10.1126/science.3103217;
75. Sheikh, T.; Gupta, P.; Gowda, P.; Patrick, S.; Sen, E. Hexokinase 2 and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 transcriptionally coactivate xanthine oxidoreductase expression in stressed glioma cells. *J Biol Chem* **2018**, *293*, 4767-4777, doi:10.1074/jbc.M117.816785;
76. Wolf, A.; Agnihotri, S.; Micallef, J.; Mukherjee, J.; Sabha, N.; Cairns, R.; Hawkins, C.; Guha, A. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J Exp Med* **2011**, *208*, 313-326, doi:10.1084/jem.20101470;
77. Jain, S.; Wang, X.; Chang, C.C.; Ibarra-Drendall, C.; Wang, H.; Zhang, Q.; Brady, S.W.; Li, P.; Zhao, H.; Dobbs, J., et al. Src Inhibition Blocks c-Myc Translation and Glucose Metabolism to Prevent the Development of Breast Cancer. *Cancer Res* **2015**, *75*, 4863-4875, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2345;
78. Singleton, K.R.; Crawford, L.; Tsui, E.; Manchester, H.E.; Maertens, O.; Liu, X.; Liberti, M.V.; Magpusao, A.N.; Stein, E.M.; Tingley, J.P., et al. Melanoma Therapeutic Strategies that Select against Resistance by Exploiting MYC-Driven Evolutionary Convergence. *Cell Rep* **2017**, *21*, 2796-2812, doi:10.1016/j.celrep.2017.11.022;
79. Battistello, E.; Katanayeva, N.; Dheilly, E.; Tavernari, D.; Donaldson, M.C.; Bonsignore, L.; Thome, M.; Christie, A.L.; Murakami, M.A.; Michielin, O., et al. Pan-SRC kinase inhibition blocks B-cell receptor oncogenic signaling in non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **2018**, *131*, 2345-2356, doi:10.1182/blood-2017-10-809210;
80. Zhao, S.J.; Shen, Y.F.; Li, Q.; He, Y.J.; Zhang, Y.K.; Hu, L.P.; Jiang, Y.Q.; Xu, N.W.; Wang, Y.J.; Li, J., et al. SLIT2/ROBO1 axis contributes to the Warburg effect in osteosarcoma through activation of SRC/ERK/c-MYC/PFKFB2 pathway. *Cell Death Dis* **2018**, *9*, 390, doi:10.1038/s41419-018-0419-y;
81. Bhummaphan, N.; Petpiroon, N.; Prakhongcheep, O.; Sritularak, B.; Chanvorachote, P. Lusianthridin targeting of lung cancer stem cells via Src-STAT3 suppression. *Phytomedicine* **2019**, *62*, 152932, doi:10.1016/j.phymed.2019.152932;
82. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H., et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462-477, doi:10.1016/j.cell.2013.09.034;
83. Hodgson, J.G.; Yeh, R.F.; Ray, A.; Wang, N.J.; Smirnov, I.; Yu, M.; Hariono, S.; Silber, J.; Feiler, H.S.; Gray, J.W., et al. Comparative analyses of gene copy number and mRNA expression in glioblastoma multiforme tumors and xenografts. *Neuro Oncol* **2009**, *11*, 477-487, doi:10.1215/15228517-2008-113;
84. Annibali, D.; Whitfield, J.R.; Favuzzi, E.; Jauset, T.; Serrano, E.; Cuartas, I.; Redondo-Campos, S.; Folch, G.; González-Juncà, A.; Sodrì, N.M., et al. Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nat Commun* **2014**, *5*, 4632, doi:10.1038/ncomms5632;
85. Kerosuo, L.; Piltti, K.; Fox, H.; Angers-Loustau, A.; Häyry, V.; Eilers, M.; Sariola, H.; Wartiovaara, K. Myc increases self-renewal in neural progenitor cells through Miz-1. *J Cell Sci* **2008**, *121*, 3941-3950, doi:10.1242/jcs.024802;
86. Tateishi, K.; Iafrate, A.J.; Ho, Q.; Curry, W.T.; Batchelor, T.T.; Flaherty, K.T.; Onozato, M.L.; Lelic, N.; Sundaram, S.; Cahill, D.P., et al. Myc-Driven Glycolysis Is a

- Therapeutic Target in Glioblastoma. *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 4452-4465, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2274;
87. Jin, Y.; Cai, Q.; Shenoy, A.K.; Lim, S.; Zhang, Y.; Charles, S.; Tarrash, M.; Fu, X.; Kamarajugadda, S.; Trevino, J.G., et al. Src drives the Warburg effect and therapy resistance by inactivating pyruvate dehydrogenase through tyrosine-289 phosphorylation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 25113-25124, doi:10.18632/oncotarget.7159;
88. Salvi, M.; Brunati, A.M.; Bordin, L.; La Rocca, N.; Clari, G.; Toninello, A. Characterization and location of Src-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1589*, 181-195, doi:10.1016/s0167-4889(02)00174-x;
89. Djeungoue-Petga, M.A.; Lurette, O.; Jean, S.; Hamel-Côté, G.; Martín-Jiménez, R.; Bou, M.; Cannich, A.; Roy, P.; Hebert-Chatelain, E. Intramitochondrial Src kinase links mitochondrial dysfunctions and aggressiveness of breast cancer cells. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 940, doi:10.1038/s41419-019-2134-8;
90. Ge, H.; Zhao, M.; Lee, S.; Xu, Z. Mitochondrial Src tyrosine kinase plays a role in the cardioprotective effect of ischemic preconditioning by modulating complex I activity and mitochondrial ROS generation. *Free Radic Res* **2015**, *49*, 1210-1217, doi:10.3109/10715762.2015.1050013;
91. Tibaldi, E.; Brunati, A.M.; Massimino, M.L.; Stringaro, A.; Colone, M.; Agostinelli, E.; Arancia, G.; Toninello, A. Src-Tyrosine kinases are major agents in mitochondrial tyrosine phosphorylation. *J Cell Biochem* **2008**, *104*, 840-849, doi:10.1002/jcb.21670;
92. Demory, M.L.; Boerner, J.L.; Davidson, R.; Faust, W.; Miyake, T.; Lee, I.; Hüttemann, M.; Douglas, R.; Haddad, G.; Parsons, S.J. Epidermal growth factor receptor translocation to the mitochondria: regulation and effect. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 36592-36604, doi:10.1074/jbc.M109.000760;
93. Salvi, M.; Brunati, A.M.; Toninello, A. Tyrosine phosphorylation in mitochondria: a new frontier in mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* **2005**, *38*, 1267-1277, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.006;
94. Hebert-Chatelain, E.; Jose, C.; Gutierrez Cortes, N.; Dupuy, J.W.; Rocher, C.; Dachary-Prigent, J.; Letellier, T. Preservation of NADH ubiquinone-oxidoreductase activity by Src kinase-mediated phosphorylation of NDUFB10. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1817*, 718-725, doi:10.1016/j.bbabi.2012.01.014;
95. Cvrljevic, A.N.; Akhavan, D.; Wu, M.; Martinello, P.; Furnari, F.B.; Johnston, A.J.; Guo, D.; Pike, L.; Cavenee, W.K.; Scott, A.M., et al. Activation of Src induces mitochondrial localisation of de2-7EGFR (EGFRvIII) in glioma cells: implications for glucose metabolism. *J Cell Sci* **2011**, *124*, 2938-2950, doi:10.1242/jcs.083295;
96. Tan, H.Y.; Wang, N.; Lam, W.; Guo, W.; Feng, Y.; Cheng, Y.C. Targeting tumour microenvironment by tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 43, doi:10.1186/s12943-018-0800-6;
97. Knight, Z.A.; Lin, H.; Shokat, K.M. Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 130-137, doi:10.1038/nrc2787;
98. Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R.A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 835-844, doi:10.1038/nrd2130;
99. Roskoski, R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* **2015**, *94*, 9-25, doi:10.1016/j.phrs.2015.01.003;

100. Roskoski, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res* **2020**, *152*, 104609, doi:10.1016/j.phrs.2019.104609;
101. Kantarjian, H.; Jabbour, E.; Grimley, J.; Kirkpatrick, P. Dasatinib. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 717-718, doi:10.1038/nrd2135;
102. Bantscheff, M.; Eberhard, D.; Abraham, Y.; Bastuck, S.; Boesche, M.; Hobson, S.; Mathieson, T.; Perrin, J.; Raida, M.; Rau, C., et al. Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 1035-1044, doi:10.1038/nbt1328;
103. Rix, U.; Hantschel, O.; Dürnberger, G.; Remsing Rix, L.L.; Planyavsky, M.; Fernbach, N.V.; Kaupe, I.; Bennett, K.L.; Valent, P.; Colinge, J., et al. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* **2007**, *110*, 4055-4063, doi:10.1182/blood-2007-07-102061;
104. Weisberg, E.; Manley, P.W.; Cowan-Jacob, S.W.; Hochhaus, A.; Griffin, J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 345-356, doi:10.1038/nrc2126;
105. Soverini, S.; Gnani, A.; Colarossi, S.; Castagnetti, F.; Abruzzese, E.; Paolini, S.; Merante, S.; Orlandi, E.; de Matteis, S.; Gozzini, A., et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second- or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood* **2009**, *114*, 2168-2171, doi:10.1182/blood-2009-01-197186;
106. Rivera-Torres, J.; San José, E. Src Tyrosine Kinase Inhibitors: New Perspectives on Their Immune, Antiviral, and Senotherapeutic Potential. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 1011, doi:10.3389/fphar.2019.01011;
107. Han, X.; Zhang, W.; Yang, X.; Wheeler, C.G.; Langford, C.P.; Wu, L.; Filippova, N.; Friedman, G.K.; Ding, Q.; Fathallah-Shaykh, H.M., et al. The role of Src family kinases in growth and migration of glioma stem cells. *Int J Oncol* **2014**, *45*, 302-310, doi:10.3892/ijo.2014.2432;
108. Lewis-Tuffin, L.J.; Feathers, R.; Hari, P.; Durand, N.; Li, Z.; Rodriguez, F.J.; Bakken, K.; Carlson, B.; Schroeder, M.; Sarkaria, J.N., et al. Src family kinases differentially influence glioma growth and motility. *Mol Oncol* **2015**, *9*, 1783-1798, doi:10.1016/j.molonc.2015.06.001;
109. Milano, V.; Piao, Y.; LaFortune, T.; de Groot, J. Dasatinib-induced autophagy is enhanced in combination with temozolomide in glioma. *Mol Cancer Ther* **2009**, *8*, 394-406, doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0669;
110. Huvelde, D.; Lewis-Tuffin, L.J.; Carlson, B.L.; Schroeder, M.A.; Rodriguez, F.; Giannini, C.; Galanis, E.; Sarkaria, J.N.; Anastasiadis, P.Z. Targeting Src family kinases inhibits bevacizumab-induced glioma cell invasion. *PLoS One* **2013**, *8*, e56505, doi:10.1371/journal.pone.0056505;
111. Galanis, E.; Anderson, S.K.; Twohy, E.L.; Carrero, X.W.; Dixon, J.G.; Tran, D.D.; Jeyapalan, S.A.; Anderson, D.M.; Kaufmann, T.J.; Feathers, R.W., et al. A phase 1 and randomized, placebo-controlled phase 2 trial of bevacizumab plus dasatinib in patients with recurrent glioblastoma: Alliance/North Central Cancer Treatment Group N0872. *Cancer* **2019**, *125*, 3790-3800, doi:10.1002/cncr.32340;

112. Schiff, D.; Sarkaria, J. Dasatinib in recurrent glioblastoma: failure as a teacher. *Neuro Oncol* **2015**, *17*, 910-911, doi:10.1093/neuonc/nov086;
113. Lassman, A.B.; Pugh, S.L.; Gilbert, M.R.; Aldape, K.D.; Geinoz, S.; Beumer, J.H.; Christner, S.M.; Komaki, R.; DeAngelis, L.M.; Gaur, R., et al. Phase 2 trial of dasatinib in target-selected patients with recurrent glioblastoma (RTOG 0627). *Neuro Oncol* **2015**, *17*, 992-998, doi:10.1093/neuonc/nov011;
114. Agarwal, S.; Mittapalli, R.K.; Zellmer, D.M.; Gallardo, J.L.; Donelson, R.; Seiler, C.; Decker, S.A.; Santacruz, K.S.; Pokorny, J.L.; Sarkaria, J.N., et al. Active efflux of Dasatinib from the brain limits efficacy against murine glioblastoma: broad implications for the clinical use of molecularly targeted agents. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 2183-2192, doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0552;
115. Hanke, J.H.; Gardner, J.P.; Dow, R.L.; Changelian, P.S.; Brissette, W.H.; Weringer, E.J.; Pollok, B.A.; Connelly, P.A. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **1996**, *271*, 695-701, doi:10.1074/jbc.271.2.695;
116. Nomura, N.; Nomura, M.; Sugiyama, K.; Hamada, J. Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells. *Int J Mol Med* **2007**, *20*, 511-519;
117. Park, S.Y.; Park, J.W.; Lee, G.W.; Li, L.; Chun, Y.S. Inhibition of neddylation facilitates cell migration through enhanced phosphorylation of caveolin-1 in PC3 and U373MG cells. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 30, doi:10.1186/s12885-017-3942-9;
118. Park, C.M.; Park, M.J.; Kwak, H.J.; Lee, H.C.; Kim, M.S.; Lee, S.H.; Park, I.C.; Rhee, C.H.; Hong, S.I. Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer Res* **2006**, *66*, 8511-8519, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4340;
119. Eom, K.Y.; Cho, B.J.; Choi, E.J.; Kim, J.H.; Chie, E.K.; Wu, H.G.; Kim, I.H.; Paek, S.H.; Kim, J.S.; Kim, I.A. The Effect of Chemoradiotherapy with SRC Tyrosine Kinase Inhibitor, PP2 and Temozolomide on Malignant Glioma Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Res Treat* **2016**, *48*, 687-697, doi:10.4143/crt.2014.320;
120. Puttini, M.; Coluccia, A.M.; Boschelli, F.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Donella-Deana, A.; Ahmed, S.; Redaelli, S.; Piazza, R.; Magistroni, V., 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* **2006**, *66*, 11314-11322, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1199;
121. Taylor, J.W.; Dietrich, J.; Gerstner, E.R.; Norden, A.D.; Rinne, M.L.; Cahill, D.P.; Stemmer-Rachamimov, A.; Wen, P.Y.; Betensky, R.A.; Giorgio, D.H., et al. Phase 2 study of bosutinib, a Src inhibitor, in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* **2015**, *121*, 557-563, doi:10.1007/s11060-014-1667-z;
122. Chang, Y.M.; Bai, L.; Liu, S.; Yang, J.C.; Kung, H.J.; Evans, C.P. Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530. *Oncogene* **2008**, *27*, 6365-6375, doi:10.1038/onc.2008.250;
123. De Luca, A.; D'Alessio, A.; Gallo, M.; Maiello, M.R.; Bode, A.M.; Normanno, N. Src and CXCR4 are involved in the invasiveness of breast cancer cells with acquired resistance to lapatinib. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 148-156, doi:10.4161/cc.26899;
124. Nair, R.R.; Tolentino, J.H.; Hazlehurst, L.A. Role of STAT3 in Transformation and Drug Resistance in CML. *Front Oncol* **2012**, *2*, 30, doi:10.3389/fonc.2012.00030;

125. Huang, S. Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 1362-1366, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2313;
126. Ma, J.H.; Qin, L.; Li, X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal* **2020**, *18*, 33, doi:10.1186/s12964-020-0527-z;
127. Liu, Q.; Wang, L.; Li, D.; Zhao, J.; Chen, S.; Li, J. Synergistic effect of STAT3-targeted small interfering RNA and AZD0530 against glioblastoma in vitro and in vivo. *Mol Med Rep* **2019**, *20*, 3625-3632, doi:10.3892/mmr.2019.10596;
128. Angers-Loustau, A.; Hering, R.; Werbowetski, T.E.; Kaplan, D.R.; Del Maestro, R.F. SRC regulates actin dynamics and invasion of malignant glial cells in three dimensions. *Mol Cancer Res* **2004**, *2*, 595-605;
129. Cuneo, K.C.; Geng, L.; Tan, J.; Brousal, J.; Shinohara, E.T.; Osusky, K.; Fu, A.; Shyr, Y.; Wu, H.; Hallahan, D.E. SRC family kinase inhibitor SU6656 enhances antiangiogenic effect of irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2006**, *64*, 1197-1203, doi:10.1016/j.ijrobp.2005.11.014;
130. Cortes, J.E.; Kantarjian, H.; Shah, N.P.; Bixby, D.; Mauro, M.J.; Flinn, I.; O'Hare, T.; Hu, S.; Narasimhan, N.I.; Rivera, V.M., et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* **2012**, *367*, 2075-2088, doi:10.1056/NEJMoa1205127;
131. Miller, G.D.; Bruno, B.J.; Lim, C.S. Resistant mutations in CML and Ph(+)-ALL - role of ponatinib. *Biologics* **2014**, *8*, 243-254, doi:10.2147/BTT.S50734;
132. Zhang, J.; Zhou, Q.; Gao, G.; Wang, Y.; Fang, Z.; Li, G.; Yu, M.; Kong, L.; Xing, Y.; Gao, X. The effects of ponatinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, against human U87 malignant glioblastoma cells. *Onco Targets Ther* **2014**, *7*, 2013-2019, doi:10.2147/OTT.S67556;
133. Laramy, J.K.; Kim, M.; Gupta, S.K.; Parrish, K.E.; Zhang, S.; Bakken, K.K.; Carlson, B.L.; Mladek, A.C.; Ma, D.J.; Sarkaria, J.N., et al. Heterogeneous Binding and Central Nervous System Distribution of the Multitargeted Kinase Inhibitor Ponatinib Restrict Orthotopic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Model of Glioblastoma. *J Pharmacol Exp Ther* **2017**, *363*, 136-147, doi:10.1124/jpet.117.243477;
134. Lee, E.Q.; Muzikansky, A.; Duda, D.G.; Gaffey, S.; Dietrich, J.; Nayak, L.; Chukwueke, U.N.; Beroukhim, R.; Doherty, L.; Laub, C.K., et al. Phase II trial of ponatinib in patients with bevacizumab-refractory glioblastoma. *Cancer Med* **2019**, *8*, 5988-5994, doi:10.1002/cam4.2505;
135. Arvanitis, C.D.; Ferraro, G.B.; Jain, R.K. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **2020**, *20*, 26-41, doi:10.1038/s41568-019-0205-x;
136. Ceccherini, E.; Indovina, P.; Zamperini, C.; Dreassi, E.; Casini, N.; Cutaia, O.; Forte, I.M.; Pentimalli, F.; Esposito, L.; Polito, M.S., et al. SRC family kinase inhibition through a new pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivative as a feasible approach for glioblastoma treatment. *J Cell Biochem* **2015**, *116*, 856-863, doi:10.1002/jcb.25042;
137. Sanna, M.; Sicilia, G.; Alazzo, A.; Singh, N.; Musumeci, F.; Schenone, S.; Spriggs, K.A.; Burley, J.C.; Garnett, M.C.; Taresco, V., et al. Water Solubility Enhancement of Pyrazolo[3,4-. *ACS Med Chem Lett* **2018**, *9*, 193-197, doi:10.1021/acsmchemlett.7b00456;

138. Thorne, R.G.; Nicholson, C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 5567-5572, doi:10.1073/pnas.0509425103;
139. Skaga, E.; Kuleskiy, E.; Fayzullin, A.; Sandberg, C.J.; Potdar, S.; Kyttälä, A.; Langmoen, I.A.; Laakso, A.; Gaál-Paavola, E.; Perola, M., et al. Intertumoral heterogeneity in patient-specific drug sensitivities in treatment-naïve glioblastoma. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 628, doi:10.1186/s12885-019-5861-4;
140. Radi, M.; Tintori, C.; Musumeci, F.; Brullo, C.; Zamperini, C.; Dreassi, E.; Fallacara, A.L.; Vignaroli, G.; Crespan, E.; Zanolli, S.; Laurenzana, I.; Filippi, I.; Maga, G.; Schenone, S.; Angelucci, A.; Botta, M. 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*(13):5382-94.doi: 10.1021/jm400233w. Epub 2013 Jun 20;
141. Tintori, C.; Fallacara, A.L.; Radi, M.; Zamperini, C.; Dreassi, E.; Crespan, E.; Maga, G.; Schenone, S.; Musumeci, F.; Brullo, C.; Richters, A.; Gasparrini, F.; Angelucci, A.; Festuccia, C.; Delle Monache, S.; Rauh, D.; Botta, M. 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** *8*;58(1):347-61;
142. Carraro, F.; Naldini, A.; Pucci, A.; Locatelli, G.A.; Maga, G.; Schenone, S.; Bruno, O.; Ranise, A.; Bondavalli, F.; Brullo, C.; Fossa, P.; Menozzi, G.; Mosti, L.; Modugno, M.; Tintori, C.; Manetti, F.; Botta, M. 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*, 1549-1556.