

Design, synthesis, and antiproliferative activity of novel 4-anilinoquinazoline derivatives

Abdolrahim Makhtoumi¹,
Ramin Babaei¹,
Sara Dabirian²,
Saeed Ghasemi³

¹Pharm D, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

² Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

³Associate Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

(Received January 7, 2025; Accepted August 30, 2025)

Abstract

Background and purpose: Inhibition of tyrosine kinases plays a crucial role in cancer treatment. Several drugs bearing an anilinoquinazoline core and acting through this mechanism have been approved by the FDA for cancer therapy. In this study, a series of new 4-anilinoquinazoline derivatives were designed, synthesized, and evaluated for their anticancer activity.

Materials and methods: Novel 4-anilinoquinazoline derivatives featuring piperidine and N, N-dimethylamine groups at the 7-position of the quinazoline core were designed, synthesized, and evaluated for their cytotoxic activity against A431, HUVEC, and HU02 cell lines. Molecular docking studies were performed to evaluate the binding interactions of the compounds with EGFR and VEGFR-2. Finally, a wound healing assay was conducted to assess the ability of the compounds to inhibit cell migration.

Results: Compounds 8d and 8f exhibited greater cytotoxicity against both cell lines compared to vandetanib ($IC_{50} = 10.62 \mu M$ for A431 and $5.75 \mu M$ for HUVEC), with IC_{50} values of 1.99 and $2.57 \mu M$ for A431, and 3.83 and $5.64 \mu M$ for HUVEC, respectively. Compound 8d demonstrated the highest selectivity index on both cell lines (18.55 for A431 and 9.64 for HUVEC). Molecular docking studies revealed that compound 8d, bearing a 4-bromo-2-fluoro substituent at the 4-position of the quinazoline nucleus and a piperidine group at the 7-position of the quinazoline ring, exhibited stronger binding affinity to EGFR (binding energy: -8.6 kcal/mol) and VEGFR-2 (binding energy: -8.8 kcal/mol) than vandetanib. In addition, compound 8d inhibited cell migration by approximately 90%.

Conclusion: Compound 8d, which exhibited the most potent cytotoxic and anti-migratory activities, appears to be a promising lead compound for further structural optimization and biological investigation.

Keywords: synthesis, cytotoxicity, 4-anilinoquinazoline, molecular docking, wound healing assay

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (249): 3-19 (Persian).

Corresponding Author: Saeed Ghasemi - School of Pharmacy, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
(E-mail: ghasemi_saeed@yahoo.com)

طراحی، سنتز و بررسی اثرات سمیت سلولی مشتقات جدید ۴- آنیلینوکینازولین

عبدالرحیم مختومی^۱

رامین بابایی^۱

سارا دبیریان^۲

سعید قاسمی^۳

چکیده

سابقه و هدف: مهار تیروزین کینازها، نقش مهمی در درمان سرطان دارند و داروهای مختلفی حاوی هسته آنیلینوکینازولین با این مکانیسم اثر جهت درمان سرطان مورد تایید FDA قرار گرفته‌اند. این مطالعه با هدف بررسی تعدادی مشتق جدید ۴-آنیلینوکینازولین سنتز و اثرات سمیت سلولی و پتانسیل ترمیم زخم به روش درون تن، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، مشتقات جدید ۴-آنیلینوکینازولین حاوی گروه‌های پیپریدین و N و N-دی متیل آمین در موقعیت ۷ حلقه کینازولین طراحی و سنتز شدند و فعالیت سیتوتوکسیک بر روی رده‌های سلولی A431، HVEC و HU02 مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی الگوی اتصال ترکیبات با بخش تیروزین کیناز EGFR و VEGFR-2، مطالعات داکینگ مولکولی انجام شد. در نهایت، سنجش ترمیم زخم به روش برون تن برای ارزیابی قدرت ترکیبات در مهار مهاجرت سلولی صورت پذیرفت.

یافته‌ها: ترکیبات 8d و 8f سمیت سلولی بهتری را در برابر هر دو رده سلولی به ترتیب با IC_{50} معادل ۱/۹۹ و ۲/۵۷ میکرومولار بر روی A431 و IC_{50} معادل ۳/۸۳ و ۵/۶۴ میکرومولار بر روی HVEC در مقایسه با واندانیت به عنوان داروی استاندارد (IC_{50} معادل ۱۰/۶۲ میکرومولار بر روی A431 و ۵/۷۵ میکرومولار بر روی HVEC) از خود نشان دادند. ترکیب 8d بیش‌ترین شاخص انتخابی را بر روی هر دو رده سلولی (۱۸/۵۵ بر روی A431 و ۹/۶۴ بر روی HVEC) نشان داد. مطالعات داکینگ مولکولی نشان داد که ترکیب 8d که دارای گروه ۴-برومو-۲-فلوئوروآنیلین در موقعیت ۴ هسته کینازولین و پیپریدین در موقعیت ۷ حلقه کینازولین است، انرژی اتصال بالاتری به EGFR (انرژی اتصال ۸/۶- کیلوکالری بر مول) و VEGFR-2 (انرژی اتصال ۸/۸- کیلوکالری بر مول) نسبت به واندانیت نشان داد. علاوه بر این، ترکیب 8d تا ۹۰ درصد باعث کاهش مهاجرت سلولی شد.

استنتاج: ترکیب 8d که بهترین سمیت سلولی و فعالیت بازدارندگی را در مهاجرت سلولی نشان داد، می‌تواند کاندیدای مناسبی برای مطالعات درون تن و بهینه‌سازی ساختاری باشد.

واژه های کلیدی: سنتز، سمیت سلولی، ۴-آنیلینوکینازولین، داکینگ مولکولی، التیام زخم

E-mail: ghasemi_saeed@yahoo.com

مؤلف مسئول: سعید قاسمی - رشت: دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۱. داروساز، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۶/۸

مقدمه

پروتئین کینازها نقش مهمی در مسیرهای سیگنالینگ سلولی ایفا می کنند، که می توانند عملکردهای سلولی مختلف مانند تکثیر سلولی، رگزایی، تمایز و مهاجرت سلولی را تنظیم کند (۱-۳). گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) به عنوان یک گیرنده تیروزین کیناز (RTK)، عضوی از خانواده ErbB است که از چهار عضو مرتبط، شامل ErbB1 (EGFR)، ErbB2 (HER-2/neu)، ErbB3 (HER-3) و ErbB4 (HER-4) تشکیل شده است (۴-۶). برای فعال سازی بخش تیروزین کیناز داخل سلولی و مسیرهای سیگنال دهی پایین دست، لیگاند هایی مانند فاکتورهای رشد اپیدرمی (EGF) باید به بخش خارج سلولی EGFR متصل شوند تا دایمر شدن و اتوفسفریلاسیون اتفاق بیفتد (۷). اختلال در عملکرد EGFR، که به دلیل فعالیت بیش از حد، بیان بیش از حد، یا جهش اتفاق می افتد، می تواند باعث ایجاد تومور و متاستاز، از طریق شروع مسیرهای مختلف انتقال سیگنال (Jak/STAT، PI3K/Akt، Ras/MAPK) و فرآیندهای سلولی شود (۸-۱۰). بنابراین، EGFR را می توان به عنوان یک هدف مناسب جهت طراحی و توسعه داروهای ضد سرطان در نظر گرفت (۱۱-۱۳). آنژیوژنز، تولید شبکه های عروق خونی جدید از عروق موجود، فرآیند اساسی برای رشد فیزیولوژیکی و همچنین رشد و متاستاز تومور است (۱۴). گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی نوع ۲ (VEGFR-2/KDR)، به عنوان عضوی از خانواده گیرنده های فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGFRs)، می تواند با استفاده از اتصال به فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) فعال شود. این اتصال به بخش خارج سلولی VEGFR-2 می تواند شروع انتقال سیگنال پایین دست را فعال کند، که در نتیجه می تواند باعث رگزایی، افزایش نفوذپذیری عروق، تکثیر و مهاجرت سلول های تومور شود (۱۵، ۱۶). مهار VEGFR-2 برای مهار آنژیوژنز و درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۷). EGFR و VEGFR-2 که دارای مسیرهای سیگنالینگ پایین دست و روابط عملکردی مشترک

هستند، می توانند در ایجاد انواع بدخیمی ها نقش داشته باشند. علاوه بر این، مهار EGFR منجر به کاهش بیان VEGF می شود که نقش اصلی را به عنوان القا کننده آنژیوژنز تومور ایفا می کند. همچنین، مهار VEGFR-2 باعث افزایش فعالیت ضد سرطانی مهار کننده های EGFR می شود (۷، ۸). بنابراین، به دلیل اثر هم افزایی، به نظر می رسد مهار همزمان مسیرهای سیگنالینگ EGFR و VEGFR-2 یک روش موثر برای درمان سرطان باشد (۱۸). هسته کینازولین، به ویژه ۴-آیلینو کینازولین، به دلیل فعالیت های بیولوژیکی متعدد، به ویژه مهارکنندگی EGFR و VEGFR-2، در سال های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۹). چندین دارو شامل ارلوتینیب، آفاتینیب، و اوسیمرتینیب به عنوان مهار کننده های تیروزین کیناز EGFR و واندتانیب به عنوان مهار کننده ی دوگانه VEGFR-2/EGFR دارای ساختار ۴-آیلینو کینازولینی هستند که برای درمان های انواع مختلف سرطان ها مورد تأیید FDA قرار گرفته اند (۹، ۲۰، ۲۱).

مهار فعالیت تیروزین کیناز، توسط مشتقات ۴-آیلینو کینازولین از طریق برهمکنش با محل اتصال آدنوزین تری فسفات (ATP) بخش تیروزین کینازی داخل سلولی EGFR و VEGFR-2 انجام می شود (۲۵-۲۲). مطالعه رابطه ساختمان-فعالیت (SAR) هسته ۴-آیلینو کینازولین نشان داد که قرار دادن گروه های بزرگ لیپوفیل و الکترون کشنده مانند کلر یا برم در موقعیت های ۳ و ۴ حلقه آنیلین باعث افزایش اثر بخشی این دسته از ترکیبات می شود. در حالی که گروه های کوچک مانند فلوروئور و هیدروژن در موقعیت ارتو این حلقه ترجیح داده می شوند. بررسی هسته کینازولین نشان داد که محدودیت تغییر در موقعیت ۶ حلقه کینازولین وجود دارد و متوکسی در این موقعیت ارجح ترین گروه است، در حالی که انواع مختلف گروه ها، از جمله زنجیره های جانبی خنثی، بازی و هتروسیکل در موقعیت ۷ هسته کینازولین، منجر به ایجاد مشتقات با اثرات ضد سرطانی قوی و مهارکنندگی چشمگیری بر روی تیروزین کینازهای EGFR و VEGFR-2 می شوند (۲۶).

۲۷. هسته کینازولین با زنجیره‌های جانبی بازی در موقعیت ۷ این هسته، فعالیت مهار قوی بر روی تیروزین کینازهای EGFR و VEGFR-2 در تحقیقات برون تن و درون تنی نشان داده است (۲۴، ۳۰-۲۸). در این تحقیق، تعدادی از مشتقات جدید ۴-آیلینو کینازولین بر اساس ساختار و اندتایب طراحی و سنتز شدند. ترکیبات سنتز شده از نظر سمیت سلولی بر روی رده سلولی A431 (سلول کارسینوم اپیدرموئید انسانی) به عنوان یک رده سلولی سرطانی با بیان بیش از حد EGFR، HUVEC (سلول اندوتلیال ورید ناف انسانی)، و HU02 (سلول فیروبیلاست انسانی) به عنوان یک رده سلولی طبیعی با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. هم‌چنین مطالعات داکینگ مولکولی توسط نرم افزار AutoDock بر روی ساختارهای کریستالی بخش تیروزین کیناز EGFR و VEGFR-2 جهت بررسی نحوه اتصال و انرژی اتصال ترکیبات سنتز شده انجام شد. علاوه بر این، سنجش مهاجرت سلولی برای بررسی اثرات ترکیبات سنتز شده بر مهاجرت سلولی سلول‌های HUVEC انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی با کد اخلاق IR.GUMS.REC.1398.417، تمام مواد و حلال‌های مورد استفاده از شرکت‌های مرک و سیگما آلدریج خریداری شدند و بدون خالص‌سازی در واکنش‌ها استفاده شدند. رده‌های سلولی A431 و HU02 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. رده سلولی HUVEC از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. نقاط ذوب (تصحیح نشده) با استفاده از دستگاه نقطه ذوب الکتروترمال ۹۱۰۰ اندازه‌گیری شدند. طیف مادون قرمز (IR) توسط اسپکتروفتومتر Perkin-Elmer Spectrum Two FT-IR، که به بازتابش کلی کاهش یافته (ATR) مجهز شده بود در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ، به دست آمد. تمام طیف‌های $^1\text{H-NMR}$ و $^{13}\text{C-NMR}$ با استفاده از طیف‌سنج Bruker FT-500 MHz با استفاده از حلال

DMSO- d_6 ثبت شد و تغییرات شیمیایی (δ) بر حسب ppm گزارش شد (ترا متیل سیلان (TMS) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد). طیف جرمی توسط طیف سنج جرمی Agilent 5973 (70 eV) ثبت شد. کنترل پیشرفت واکنش‌ها توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) با استفاده از پلیت‌های سیلیکاژل مرک 60F254 انجام شد. کروماتوگرافی ستونی بر روی سیلیکاژل مرک ۶۰ با اندازه ذرات ۰/۰۶-۰/۰۲ میلی متر انجام شد.

سنتز مشتقات

مشتقات ۱-۷ طبق روش مندرج در مقالات سنتز گردید و با روش‌های FT-IR، $^1\text{H-NMR}$ ، $^{13}\text{C-NMR}$ و طیف سنجی جرمی مورد تایید قرار گرفت (۳۸-۳۱).

روش عمومی سنتز مشتقات ۷-(۲-(R')-اتوکسی)-۶-متوکسی-N-(R -فنیل) کینازولین-۴-آمین (۸a-f) ابتدا ۰/۱۴ میلی مول از مشتقات ۷-(۲-کلرو اتوکسی)-۶-متوکسی-N-(R -فنیل) کینازولین-۴-آمین (7a-c) در ۲ میلی لیتر DMF حل شد و مقادیر کاتالیزوری پتاسیم یدید و ۰/۱۴ میلی مول پتاسیم کربنات اضافه شد. سپس ۰/۱۶ میلی مول آمین مورد نظر (پیریدین و N-N-دی متیل آمین) به مخلوط فوق اضافه شد و مخلوط واکنش به مدت ۲ ساعت رفلاکس شد. پس از اتمام واکنش، مخلوط واکنش جهت جداسازی نمک‌های نامحلول صاف شد. به محلول واکنش، ۲ گرم یخ اضافه شد، رسوبات حاصل صاف و خشک شد. جهت خالص سازی محصولات نهایی، از کروماتوگرافی ستونی با فاز ساکن سیلیکاژل و فاز متحرک ان-هگزان: اتیل استات (۴:۶ حجمی: حجمی) استفاده شد.

بررسی سمیت سلولی

سمیت سلولی بر روی سه رده سلولی، شامل A431، HUVECs، و HU02 با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت (۳۱، ۳۲، ۳۹، ۴۰). سلول‌ها در پلیت

های ۹۶ خانه با غلظت 5×10^3 در هر چاهک کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در اتمسفر مرطوب با ۵ درصد CO_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سلول ها در معرض غلظت های مختلف (۰/۷۸، ۱/۵۶۲، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ میکرومولار) و اندتانیب و ترکیبات سنتز شده (8a-f) در محیطی با ۰/۱ درصد DMSO قرار گرفتند. سلول های تیمار شده با حلال به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند. محلول MTT با غلظت ۵mg/mL در ۷۲ PBS ساعت پس از تیمار به هر چاهک اضافه شد و سلول ها به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در نهایت، مایع رویی خارج شد. DMSO (۱۵۰ میکرولیتر در هر چاهک) برای حل کردن بلورهای فورمازان اضافه شد و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت خوان Biotek EpochTM خوانده شد.

شاخص انتخابی (SI) (Selectivity Index)

شاخص انتخابی میزان اختصاصیت اثربخشی یک ترکیب را بر روی سلول های سرطانی مشخص می کند. شاخص انتخابی، نسبت مقدار IC_{50} یک ترکیب بر روی سلول های سالم به مقدار IC_{50} سلول های سرطانی می باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش ها سه بار انجام شد و مقادیر IC_{50} (غلظت مورد نیاز برای ۵۰٪ فعالیت مهار) با استفاده از رگرسیون غیر خطی توسط منحنی دوز-پاسخ برازش نرمال شده توسط GraphPad Prism[®] نسخه ۵ به دست آمد و به صورت میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (S.D.) بر حسب میکرومولار گزارش شد (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) (۴۱).

داکینگ مولکولی

ترکیبات 8d و واندتانیب برای مطالعات داکینگ مولکولی با EGFR و VEGFR-2 استفاده شدند.

مطالعات Docking توسط AutoDock 4.2 و (ADT) AutoDock Tools 1.5.4 انجام شد. ساختار کریستالی بخش تیروزین کیناز EGFR کمپلکس شده با مهارکننده ۴-آنیلینو کینازولینی ارلوتینیب (PDB ID: 1M17) با رزولوشن ۲/۶ آنگستروم و ساختار کریستالی بخش تیروزین کیناز VEGFR-2 کمپلکس شده با مهارکننده ۳و۲-دی هیدرو-۴و۱-بنزوکسازین (PDB ID: 2RL5) با رزولوشن ۲/۶۵ آنگستروم از بانک اطلاعات پروتئین (<http://www.rcsb.org>) دانلود شد. پس از حذف لیگاندها و مولکول های آب از ساختارهای کریستالی گیرنده ها، هیدروژن ها و بارهای کولمن اضافه شدند و هیدروژن های غیر قطبی ادغام شدند. ساختار ترکیبات در نرم افزار Hyperchem 8 ترسیم شد و بهینه سازی هندسه ی مولکولی با روش مکانیک مولکولی MM+ و روش نیمه تجربی AM1 انجام شد. اندازه گرید باکس $x=90$ ، $y=90$ ، $z=90$ در نظر گرفته شد و فاصله نقاط شبکه بر روی ۳۷۵/۰ آنگستروم تنظیم شد. الگوریتم جستجوی ژنتیک لامارکی (LGA) با ۱۰۰ مرتبه اجرای GA برای جستجوی ساختاری مورد استفاده قرار گرفت. از ارلوتینیب و ۳و۲-دی هیدرو-۴و۱-بنزوکسازین به عنوان لیگاندهای کریستالی جهت معتبر سازی روش داکینگ استفاده شد. نحوه اتصال دو بعدی لیگاندها و رستپورها توسط BIOVIA Discovery Studio Visualizer مورد بررسی قرار گرفت (۳۹).

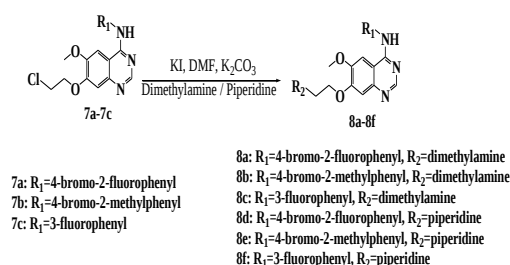
سجش ترمیم زخم به روش برون تن

سلول های HUVEC در محیط کشت DMEM گلوکز بالا در یک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. برای ایجاد یک لایه سلولی، سلول ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. وسط هر چاهک با استفاده از نوک پیپت P200 خراشیده شد. چاهک ها شسته شدند و به هر چاهک محیط کشت جدید اضافه شد. ترکیب 8d (۵ میکرومولار) به هر چاهک اضافه شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس عکس گرفته شد.

سپس سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در اتمسفر ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. پس از ۷۲ ساعت برای مقایسه سرعت مهاجرت سلولی قبل و بعد از قرار گرفتن در معرض ترکیبات سنتز شده مجدداً توسط میکروسکوپ فلورسانس عکس گرفته شد (۴۲، ۴۳).

یافته‌ها

مسیر سنتز ترکیبات 8a-f در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: مسیر سنتز ترکیبات 8a-f

نتایج مربوط به خصوصیات فیزیکوشیمیایی و طیفسنجی ترکیبات 8a-f به صورت زیر می باشد.

N-(۴-برومو-۲-فلوروفنیل)-۷-(۲-دی متیل آمینو) اتوکسی-۶-متیل کینازولین-۴-آمین (8a)
 بازده: ۴۸٪؛ نقطه ذوب=۲۲۴-۲۲۶ °C; IR (KBr, ۲۲۶-۲۲۴=):
 νmax: (CH₂O), ۱۴۱۵(NH-aniline), ۳۳۴۸cm⁻¹)
 1H NMR (DMSO-d₆, ۳۰°C): (CH₃) ۱.۳۴۰, H, H-C₂ ۱(s, ۸/۳۴H, H-N aniline), ۱(s, ۹/۶۵ppm
 ۷/۶۴H, H-C₅ quinazoline), ۱(s, ۷/۸۲quinazoline),
 (brs, 1H, H-C₃ ۷/۵۴H, H-C₆ aniline), ۱Hz, ۹(d, J=
 H, H-C₅ aniline), ۱Hz, ۷/۵(d, J=۷/۴۵aniline),
 H, ۲(brs, ۴/۱۸H, H-C₈ quinazoline), ۱(s, ۷/۲۰
 H, NCH₂), ۲(brs, ۲/۸۶,)H, OCH₃۳(s, ۳/۹۳,)OCH₂
 ۱۲۵H, N(CH₃)₂). 13CNMR (DMSO-d₆, ۳۰°C): ۲/۵۷
 , ۱۵۲/۸۶, ۱۵۳/۶۵, ۱۵۵/۶۴, ۱۵۶/۸۷MHz) δppm
 , ۱۱۹/۳۵, ۱۲۷/۴۲, ۱۲۷/۴۴, ۱۲۹/۴۸, ۱۴۶/۹۰, ۱۴۹/۰۵
 , ۵۶/۱۵, ۶۷/۲۸, ۱۰۲/۱۱, ۱۰۷/۶۸, ۱۰۸/۶۴, ۱۱۹/۱۶
 [M]⁺.۴۳۴. MS (ESI): m/z ۵۰/۹۵

N-(۴-برومو-۲-متیل فنیل)-۷-(۲-دی متیل آمینو) اتوکسی-۶-متیل کینازولین-۴-آمین (8b)
 بازده: ۴۴٪؛ نقطه ذوب=۲۰۸-۲۰۹ °C; IR (KBr, ۲۰۹-۲۰۸=):
 νmax: (CH₂O), ۱۴۱۶(NH-aniline), ۳۳۱۴cm⁻¹)
 1H NMR (DMSO-d₆, ۳۰°C): (CH₃) ۱.۲۶۵, H, H-C₂ ۱(s, ۸/۲۶H, H-N aniline), ۱(s, ۹/۴۷ppm
 ۷/۵۳H, H-C₅ quinazoline), ۱(s, ۷/۸۸quinazoline),
 H, H-C₆ ۱Hz, ۷/۵(d, J=۷/۴۲H, H-C₃ aniline), ۱(s,
 (s, ۷/۱۷H, H-C₅ aniline), ۱Hz, ۸(d, J=۷/۲۷aniline),
 ۳/۹۳,)H, OCH₂۲(brs, ۴/۲۰H, H-C₈ quinazoline), ۱
 H, ۶(s, ۲/۶۲H, NCH₂), ۲(brs, ۲/۹۰,)H, OCH₃۳(s,
 H, H-CH₃ C₂ aniline). ۳(s, ۲/۱۷N(CH₃)₂),
 , ۱۵۸/۰۴ MHz) δppm 12513CNMR (DMSO-d₆,
 , ۱۳۳/۴۳, ۱۳۷/۷۸, ۱۳۸/۳۹, ۱۴۷/۳۴, ۱۴۸/۱۷, ۱۵۳/۷۴
 , ۱۰۴/۶۱, ۱۰۸/۴۵, ۱۱۸/۹۱, ۱۲۹/۵۶, ۱۳۰/۲۵, ۱۳۳/۳۸
 . MS ۲۰/۳۶, ۵۱/۴۸, ۵۱/۵, ۵۶/۸۸, ۶۷/۶۲, ۱۰۳/۰۷
 [M]⁺.۴۳۱(ESI): m/z

N-(۳-فلوروفنیل)-۷-(۲-دی متیل آمینو) اتوکسی-۶-متیل کینازولین-۴-آمین (8c)
 بازده: ۴۴٪؛ نقطه ذوب=۲۰۸-۲۰۹ °C; IR (KBr, ۲۰۹-۲۰۸=):
 νmax: (CH₂O), ۱۴۵۹(NH-aniline), ۳۳۴۴cm⁻¹)
 1H NMR (DMSO-d₆, ۳۰°C): (CH₃) ۱.۲۵۵, H, H-C₂ ۱(s, ۸/۵۲H, H-N aniline), ۱(s, ۹/۵۹ppm
 H, H-C₂ ۱Hz, ۱۲(d, J=۷/۸۹quinazoline),
 (d, ۷/۶۲H, H-C₅ quinazoline), ۱(s, ۷/۸۶aniline),
 H, ۱Hz, ۷/۵(d, J=۷/۴۱H, H-C₆ aniline), ۱Hz, ۸J=
 ۶/۹۱(H, H-C₈ quinazoline), ۱(s, ۷/۲۳H-C₄ aniline),
 H, ۲(brs, ۴/۲۴,)Hz 1H, H-C₅ aniline ۷/۵t, J=
 H, NCH₂), ۲(brs, ۲/۹۷,)H, OCH₃۳(s, ۳/۹۷,)OCH₂
 H, N(CH₃)₂). 13CNMR (DMSO-d₆, ۳۰°C): ۲/۶۸
 , ۱۴۹/۷۶, ۱۵۳/۲۵, ۱۵۴/۱۷, ۱۵۶/۶۸MHz) δppm ۱۲۵
 , ۱۰۹/۹۴, ۱۱۰/۱۱, ۱۱۸/۰۳, ۱۳۰/۴۳, ۱۳۰/۵۰, ۱۴۷/۷۰
 , ۵۷/۰۲, ۶۷/۴۴, ۱۰۲/۷۴, ۱۰۸/۶۸, ۱۰۹/۰۴, ۱۰۹/۲۴
 [M]⁺.۳۵۶. MS (ESI): m/z ۴۷/۷۶, ۵۱/۴۵

N-(۴-برومو-۲-فلوروفنیل)-۶-متوکسی-۷-۲-
(نیم ریڈین-۱-یل) اتوکسی (کننازولین-۴-آمین (8d)

بازده: ۴۲٪؛ نقطه ذوب: ۲۳۵-۲۳۳ °C; IR (KBr, ν_{max} : ۳۳۵۹ cm⁻¹) (CH₂O), ۱۴۱۵ (NH-aniline), ۱۱۲۱ (CH) MHz): ۵۰۰. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, H, H-C₂ ۱(s, ۸/۳۵H, H-N aniline), ۱(s, ۹/۵۴δppm ۷/۶۵H, H-C₅ quinazoline), ۱(s, ۷/۷۹quinazoline), H, H-C₃ ۱(bris, ۷/۵۲H, H-C₆ aniline), ۱Hz, ۹(d, J= (s, ۷/۲۲H, H-C₅ aniline), ۱Hz, ۸(d, J=۷/۴۶aniline), ۳/۹۳), H, OCH₂ ۲(bris, ۴/۲۴H, H-C₈ quinazoline), ۱ H, ۴(bris, ۲/۳۵H, NCH₂), ۲(bris, ۲/۷۶,)H, OCH₃ ۳(s, (bris, 6H, H-C_{3,4,5} ۱/۴۲H-C_{2,6} piperidine), MHz) δppm ۱۲۵piperidine). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, , ۱۳۶/۹۷, ۱۴۶/۹۵, ۱۴۹/۰۷, ۱۵۲/۵۶, ۱۵۳/۴۸, ۱۵۶/۰۷ , ۱۰۸/۹۰, ۱۱۶/۲۷, ۱۱۶/۴۴, ۱۲۲/۲۱, ۱۲۲/۲۶, ۱۲۳/۳۵ . MS ۴۷/۰۵, ۵۰/۷۱, ۵۶/۵۰, ۶۶/۷۳, ۱۰۲/۳۹, ۱۰۷/۹۱ [M]⁺. ۴۷۵ (ESI): m/z

N-(۴-برومو-۲-متیل فینیل)-۶-متوکسی-۷-(۲-
(سیر بدین، ۱-یل) اتوکسی) کننازولین-۴-آمین (8e)

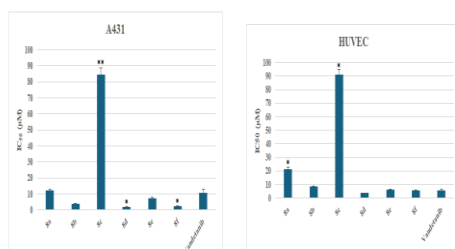
°C; IR (KBr, ۲۱۹-۲۱۷=نقطه ذوب%; ۳۶: بازده
 (CH₂O), ۱۴۹۲(NH-aniline), ۳۳۹۰.cm⁻¹) v_{max}:
 MHz): ۵۰۰O). ¹HNMR (DMSO-d₆, ۳(CH۱۳۰۲
 H, H-C₂ ۱(s, ۸/۲۷H, H-N aniline), ۱(s, ۹/۴۱δppm
 ۷/۵۳H, H-C₅ quinazoline), ۱(s, ۷/۸۴quinazoline),
 H, H-C₆ ۱Hz, ۷/۵(d, J= ۷/۴۲H, H-C₃ aniline), ۱(bris,
 (s, ۷/۱۸H, H-C₅ aniline), ۱Hz, ۸(d, J=۷/۲۷aniline),
 ۳/۹۳), H, OCH₂۲(bris, ۴/۲۳H, H-C₈ quinazoline), ۱
 H, ۴(bris, ۲/۴۲H, NCH₂), ۲(bris, ۲/۷۸, ۳H, OCH₃۳(s,
 H, H-CH₃ C₂ aniline), ۳(s, ۲/۲۱H-C_{2,6} piperidine),
 (bris, 6H, H-C_{3,4,5} piperidine). ¹³CNMR ۱/۴۲
 , ۱۵۳/۵, ۱۵۷/۰۳MHz) δppm ۱۲۵(DMSO-d₆,
 , ۱۲۸/۸۲, ۱۳۸/۱۲, ۱۴۰/۰۵, ۱۴۰/۰۷, ۱۴۷/۵, ۱۴۹/۵۸
 , ۱۰۲/۹۰, ۱۰۸/۵۴, ۱۰۹/۵۵, ۱۲۰/۱۸, ۱۲۳/۴۲, ۱۲۴/۶۴
 . ۲۱/۷۸, ۲۴/۹۴, ۲۶/۱۴, ۴۷/۶۸, ۵۱/۴۹, ۵۷/۰۰, ۶۷/۶۰
 [M]⁺.۴۷۱MS (ESI): m/z

N-(۳-فلوروفنیل)-۶-متوکسی-۷-(۲-پیپریدین-۱-یل) اتوکسی (کنازولین-۴-آمین (8f)

°C; IR (KBr, ۱۹۶-۱۹۴=نقطه ذوب%; ۴۰: بازده)
 (CH₂O), ۱۴۴۴(NH-aniline), ۳۴۰۶cm⁻¹) v_{max}:
 MHz): ۵۰۰.۰). ¹HNMR (DMSO-*d*₆, ۳(CH₃۱۲۱۳
 H, H-C₂ ۱(s, ۸/۵۱H, H-N aniline), ۱(s, ۹/۶۴δppm
 (s, ۷/۸۸(s, 1H, H-C₂ aniline), ۷/۹۱quinazoline),
 H, H-C₆ ۱Hz, ۷(d, J= ۷/۶۴H, H-C₅ quinazoline), ۱
 (s, ۷/۲۳ aniline), ۴H, H-C_۱Hz, ۷(d, J= ۷/۴aniline),
 ۵H, H-C_۱Hz, ۷(t, J=۶/۹۲H, H-C₈ quinazoline), ۱
), H, OCH₃۳(s, ۳/۹۷), H, OCH₂۲(brs, ۴/۲۴aniline),
 H, H-C_{2,6} ۴(brs, ۲/۴۰H, NCH₂), ۲(brs, ۲/۷۷
 (brs, 6H, H-C_{3,4,5} piperidine). ۱/۴۲piperidine),
 , ۱۵۶/۶۹MHz) δppm ۱۲۵¹³CNMR (DMSO-*d*₆,
 , ۱۳۰/۴۰, ۱۳۰/۴۸, ۱۴۷/۶۸, ۱۴۹/۷۲, ۱۵۳/۲۲, ۱۵۴/۲۳
 , ۱۰۸/۷۱, ۱۰۹/۰۲, ۱۰۹/۲۳, ۱۰۹/۶۲, ۱۱۰/۰۷, ۱۱۸/۰۳
 MS ۲۶/۸۲, ۴۶/۰۴, ۵۳/۳۸, ۵۷/۰۲, ۶۷/۲۰, ۱۰۲/۷۹
 [M]⁺.۳۹۶(ESI): m/z

ارزیابی سمیت سلولی مشتقات سنتز شده نهایی (8a-f) بر روی سه رده سلولی شامل HUVECs، HU02 و A431 با استفاده از روش MTT انجام شد. نتایج در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

هم‌چنین معنی‌داری تفاوت سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده با وانداتایب در تصویر شماره ۳ نمایش داده شده است.

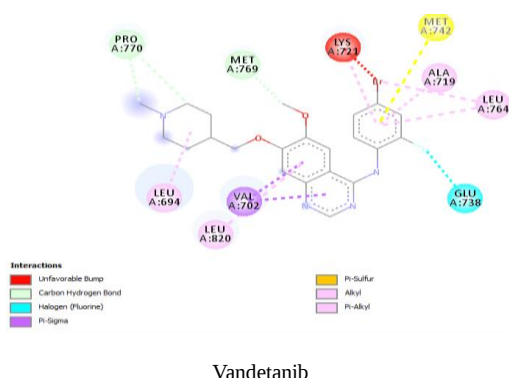
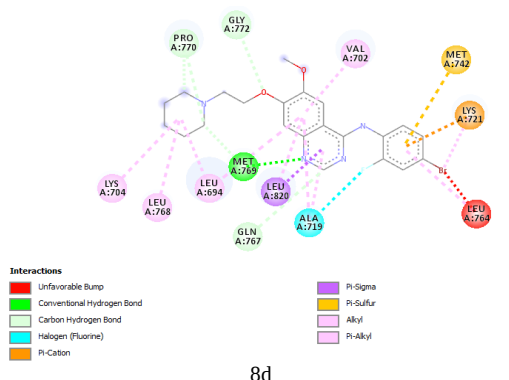


تصویر شماره ۲: IC_{50} ترکیبات 8a-f بر روی رده های سلولی A431 و HUVECs

(و اندتانب) را نشان مدهد.

جدول شماره ۱: فعالیت سیتوتوکسیک ترکیبات 8a-f بر روی رده های سلولی A431، HUVECs و HU02 و شاخص انتخابی ترکیبات بر روی رده های سلولی A431 و HUVECs

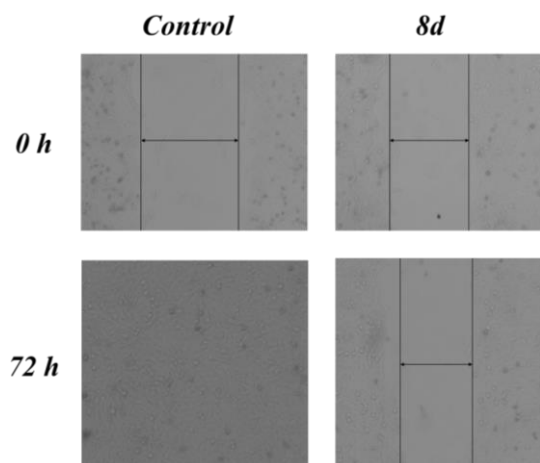
ترکیبات	R ₁	R ₂	IC ₅₀ ±SD (μM)			شاخص انتخابی	
			A431	HUVEC	HU02	A431	HUVEC
8a		N,N-دی‌متیل	1.572±0.168	1.177±0.170	>5.0	-	-
8b		N,N-دی‌متیل	7.04±0.110	4.77±0.240	7.071±0.700	1.0770	0.770
8c		N,N-دی‌متیل	>5.0	>5.0	>5.0	-	-
8d		پیردین	1.99±0.180	1.87±0.170	7.997±0.719	1.8500	0.870
8e		پیردین	7.77±0.100	8.19±0.170	7.51±0.090	7.7700	0.870
8f		پیردین	7.57±0.110	0.87±0.170	7.777±0.510	1.8770	0.870
وانداتانیب		-	1.067±0.038	0.70±0.030	>5.0	-	-



تصویر شماره ۴: برهمکنش های ترکیب 8d و وانداتانیب با EGFR

علاوه بر این، مطالعه برهمکنش ترکیب 8d و وانداتانیب با محل اتصال ATP VEGFR-2 تشکیل یک

برای بررسی برهمکنش 8d به عنوان قوی ترین ترکیب سنتز شده و وانداتانیب (داروی استاندارد)، مطالعات داکینگ مولکولی به محل اتصال ATP در بخش تیروزین کینازی EGFR و VEGFR-2 انجام شد. اعتبارسنجی توسط کانفورماسیون فعال لیگندهای ساختارهای کوکریستالی دو رسپتور انجام شد. تصویر شماره ۴ نشان می دهد که نیتروژن شماره ۱ کینازولین ترکیب 8d با Met769 محل اتصال EGFR با انرژی اتصال ۸/۶- کیلوکالری بر مول، پیوندهای هیدروژنی تشکیل می دهد (8d: 2.49 Å). وانداتانیب این برهمکنش را نشان نداد و با انرژی پیوند ۸/۴- کیلوکالری بر مول به جایگاه فعال آنزیم متصل شد. همچنین، برهمکنش های آبتگریز بین هر دو ترکیب و آمینو اسیدهای موجود در پاکت آبتگریز جایگاه فعال EGFR مشاهده شد. این آمینو اسیدها شامل Val702، Leu694، Leu764، Met742، Lys721، Ala719، Leu768، Lys704 و Leu820 برای ترکیب 8d و Val702، Met742، Glu738، Lys721، Ala719، Leu764 و Leu820 برای وانداتانیب بودند.



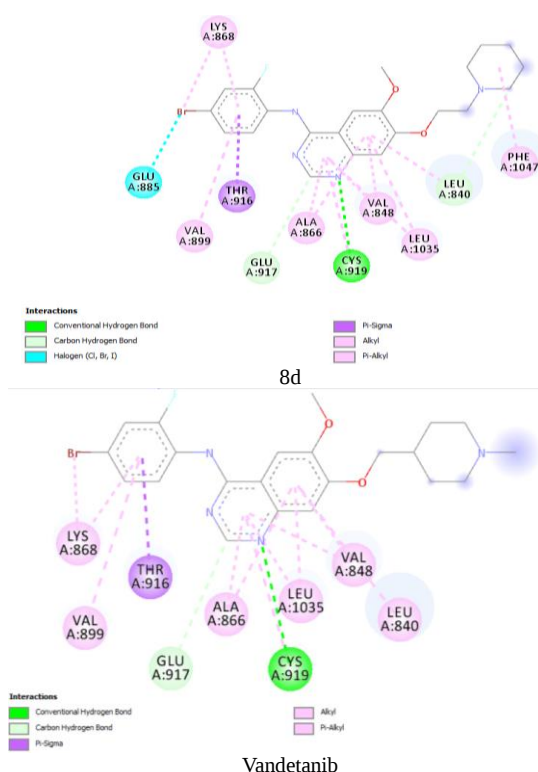
تصویر شماره ۶: تأثیر ترکیب ۸d بر مهاجرت سلولی سلول‌های HUVEC در زمان‌های ۰ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش التام زخم

بحث

ترکیبات ۱-۶ بر اساس روش‌های گزارش شده قبلی سنتز شدند. داده‌های نقطه ذوب، $^1\text{H NMR}$ و $^{13}\text{CNMR}$ برای همه این ترکیبات با گزارش‌های قبلی مطابقت داشت. جهت سنتز ترکیبات 7a-c، ترکیب ۶ با سه مشتق آنیلین، شامل ۴-برومو-۲-فلوروآنیلین، ۴-برومو-۲-متیل آنیلین، ۳-فلوروآنیلین و اکشنش داده شد (۳۸، ۳۹، ۴۰). ترکیبات نهایی (8a-f) از طریق واکنش مشتقات 7a-c و دو آمین نوع دوم (N و N-دی متیل آمین و پیریدین) در حضور پتاسیم یدید به دست آمد (۴۳، ۴۴).

از شش ترکیب آزمایش شده، پنج ترکیب فعالیت سیتوتوکسیک بهتر و قابل مقایسه ای را با واندانایب به عنوان داروی استاندارد بر روی رده های سلولی A431 و HUVEC از خود نشان دادند. ترکیبات 8b، 8d، 8e و 8f (IC_{50} کم تر از ۱۰ میکرومولار) فعالیت سیتوتوکسیک بهتری نسبت به واندانایب (IC_{50} معادل ۱۰/۶۲ میکرومولار) بر روی رده سلولی A431 از خود نشان دادند. ترکیب 8d حاوی گروه های پیریدین و ۴-برومو-۲-فلوئورو آنیلین به ترتیب در موقعیت های ۷ و ۴ حلقه کینازولین بالاترین سمیت سلولی را بر رده سلولی A431 با مقدار IC_{50} معادل ۱/۹۹ میکرومولار را از خود نشان داد. در مطالعه ای توسط Chilin و همکاران، چندین مشتق کینازولین سنتز شدند و

پیوند هیدروژنی بین نیتروژن‌های شماره ۱ حلقه کینازولین و Cys919 را نشان داد (-8.8 kcal/mol , $2.71\text{\AA}$) و -8.4 kcal/mol , $2.80\text{\AA}$ Vandetanib). هر دو ترکیب از طریق گروه ۴-برومو-۲-فلوئورو آنیلین برهمکنش‌های آبگریز را با یک پاکت آبگریز تشکیل شده توسط آمینو اسیدهای Val848, Ala866, Lys868, Thr916, Val899, Leu1035, Leu840 و Phe1047 را ایجاد کردند (تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۵: برهمکنش‌های ترکیب 8d و واندتانیب با VEGFR-2

بررسی مهاجرت سلولی برای مطالعه تاثیر ترکیبات 8d بر مهاجرت سلولی رده سلولی HUVEC انجام شد. نتایج نشان داد که ترکیب 8d قادر به جلوگیری از روند مهاجرت سلولی هستند. همان‌طور که در تصویر شماره ۶ نشان داده شده است، پس از ۷۲ ساعت، درصد بسته شدن خراش برای این ترکیب ۱۰ درصد خراش اولیه بود. در مقایسه با گروه کنترل که هیچ مهاری نشان نداد و ۱۰۰ درصد بسته شدن خراش را نشان داد.

از بین آن ها، دی اوکسینو ۴-آیلینو کینازولین حاوی ۳- متیل آیلین در موقعیت ۴ هسته کینازولین بهترین سمیت سلولی را در برابر رده سلولی A431 با IC_{50} معادل ۰/۶۷ میکرومولار از خود نشان داد (۱۰). مطالعه دیگری توسط Yu و همکاران بر روی ترکیبات جدید ۴-آیلینو کینازولین نشان داد ترکیب حاوی یک گروه ۱-آدامانتیل در موقعیت ۴ حلقه آیلین و یک گروه متوکسی اتوکسی در موقعیت های ۶ و ۷ هسته کینازولین سمیت سلولی معنی داری را در برابر رده سلولی A431 با IC_{50} معادل ۱/۰۲ میکرومولار از خود نشان داد (۱۳). علاوه بر این، مشتقات ۷و۶-بیس (۳-مورفولینوپروپوکسی) (۴-آیلینو کینازولین سنتز شدند و در این دسته ترکیب با (E) - پروپین ۱-یل در موقعیت ۴ حلقه آیلین بهترین IC_{50} (۱/۳۵ میکرومولار) را از خود نشان داد (۴۵). هم چنین مطالعات عظیمان و همکاران بر روی مشتقات ۴-آیلینو کینازولین نشان داد ترکیب حاوی تولیل در موقعیت ۴ هسته کینازولین و ایمیدازول در موقعیت ۷ حلقه کینازولین با IC_{50} معادل ۰/۱۱ میکرومولار بهترین اثر را بر روی رده سلولی A431 از خود نشان داد (۳۱، ۳۲، ۳۹). بر اساس تحقیق حاضر و سایر مطالعات، به نظر می رسد که گروه های لیوفیل مانند متیل و هالوژن های موجود بر روی حلقه آیلین و آمین های هتروسایکلیک در موقعیت ۷ هسته کینازولین می توانند باعث افزایش سمیت سلولی بر روی رده سلولی A431 شوند.

رده سلولی HUVEC مرسوم ترین سلول های اندوتلیال انسان هستند که از اندوتلیوم ورید بند ناف جدا شده اند. بررسی های آنژیوژنر آزمایشگاهی نشان داده اند که بدخیمی های همراه با آنژیوژنر، بیان بیش از حد VEGFR-2 را نشان می دهند. همچنین ثابت شده است که مهار فعالیت تیروزین کیناز VEGFR-2 ناشی از اتصال VEGF به بخش خارج سلولی VEGFR-2 موجود در رده سلولی HUVEC می تواند آنژیوژنر را متوقف کند (۴۶). اکثر ترکیبات سنتز شده سمیت سلولی قابل مقایسه با واندتانیب (داروی استاندارد) را بر روی سلول های HUVEC از خود نشان دادند. ترکیبات 8d و 8f حاوی

گروه پیریدین در موقعیت شماره ۷ هسته کینازولین و به ترتیب گروه های ۴-برومو-۲-فلوئوروآیلین و ۳-فلوئوروآیلین در موقعیت ۴ حلقه کینازولین، بهترین سمیت سلولی (IC_{50} به ترتیب ۳/۸۳ و ۵/۶۴ میکرومولار) در بین ترکیبات سنتز شده از خود نشان دادند. همچنین، ترکیبات 8c و 8e فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی به ترتیب با مقادیر IC_{50} معادل ۸/۶۲ و ۶/۱۹ میکرومولار در برابر رده سلولی HUVEC از خود نشان دادند که قابل مقایسه با واندتانیب بود. ترکیب 8c بر روی هیچ یک از رده های سلولی سمیت سلولی معنی داری را نسبت به داروی استاندارد (واندتانیب) از خود نشان نداد (IC_{50} بالاتر از ۵۰ میکرومولار).

در یک مطالعه، مشتقات اوره ۷-آمینوآلکوکسی کینازولین سنتز شدند و اکثر ترکیبات سمیت سلولی قابل توجهی را در برابر رده سلولی HUVEC با مقادیر IC_{50} در محدوده ۰/۱۲ تا ۴/۳۹ میکرومولار نشان دادند (۴۷). Xi و همکاران فعالیت سیتوتوکسیک برخی از مشتقات ۵-آیلینو کینازولین-۸-نیترو را گزارش کردند و نشان دادند که ترکیبات با قرار دادن گروه های ۳-متیل، ۲-کلرو-۵-فلوئورو و ۲ و ۵-دی کلرو بر روی فیل اوره در موقعیت ۴ هسته کینازولین فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی از خود نشان دادند (مقادیر IC_{50} به ترتیب معادل ۶/۴، ۵/۷ و ۱/۸ میکرومولار) (۱۹). حلقه کینازولین حاوی حلقه ایندازول استخلاف شده با ۳ و ۴-دی کلروفیل نیز در برابر رده سلولی HUVEC (IC_{50} معادل ۰/۰۸۷ میکرومولار) پوتنسی بسیار بالایی را نشان داد (۴۸). ترکیبات 8d و 8f سمیت سلولی بالاتری را نسبت به واندتانیب بر روی رده های سلولی A431 و HUVEC نشان دادند (مقادیر IC_{50} به ترتیب ۱/۹۹ و ۲/۵۷ میکرومولار بر روی A431 و ۳/۸۳ و ۵/۶۴ میکرومولار بر روی HUVECs). این ترکیبات احتمالاً با مهار کردن فعالیت های تیروزین کیناز EGFR و VEGFR-2 اثرات سیتوتوکسیک قابل توجهی از خود نشان می دهند و این اثر، آن ها را به کاندیدایی امیدوار کننده ای برای مطالعات پیش تر در طراحی ترکیبات ضد سرطانی جدید تبدیل

می‌کند. شایان ذکر است که همه ترکیبات، سمیت سلولی بسیار پایین تری علیه رده سلولی سالم HU02 (IC_{50} بالاتر از ۳۰ میکرومولار) نسبت به رده‌های سلولی سرطانی از خود نشان دادند. این ممکن است به دلیل بیان طبیعی EGFR و VEGFR-2 در این رده سلولی باشد. با توجه به اثر سیتوتوکسیک قوی ترکیب 8d بر روی رده‌های سلولی A431 و HUVEC، و هم‌چنین سمیت سلولی بسیار پایین بر روی رده سلولی HU02 این احتمال وجود دارد که این ترکیب اثر خود را از طریق مهار فعالیت تیروزین کیناز EGFR و VEGFR-2 اعمال می‌کند. شاخص انتخابی (SI) غلظتی از ترکیبات را نشان می‌دهد که منجر به کاهش ۵۰ درصدی زنده ماندن در سلول‌های سالم به غلظتی که می‌تواند ۵۰ درصد زنده ماندن در سلول‌های سرطانی را کاهش دهد. این شاخص برای ارزیابی ایمنی و اثر بخشی مواد مختلف استفاده می‌شود. SI بالاتر از سه اختصاصیت بیش‌تر بر روی رده‌های سلولی سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی را نشان می‌دهد. در این مطالعه، ترکیب 8d بالاترین شاخص‌های گزینش‌پذیری (۱۸/۵۵ بر روی A431 و ۹/۶۴ بر روی HUVEC) را نشان داد که نشان دهنده ایمنی این ترکیب است. تحقیقات بیش‌تر در مورد فعالیت مهار ترکیبات قوی بر روی فعالیت تیروزین کیناز EGFR و VEGFR-2 جهت تعیین مکانیسم دقیق اثر آن‌ها لازم است (۴۹).

بررسی ساختار مشتقات حاوی گروه پیریدین نشان داد بهترین اثر با حلقه آنیلین حاوی گروه‌های ۴-برومو-۲-فلورو این حلقه دیده می‌شود. جایگزینی گروه فلئور با متیل باعث کاهش معنی داری در اثرات سمیت سلولی این دسته بر روی هر دو رده سلولی سرطانی گردید. قرار دادن گروه فلئور در موقعیت متا مشابه باعث بهبود سمیت سلولی این گروه نسبت به واندتانیب بر روی هر دو رده سلول‌های سرطانی شد. به‌طور کلی در این دسته گروه‌های الکترون کشنده بر روی حلقه آنیلین بدون در نظر گرفتن موقعیت باعث بهبود اثر بخشی نسبت به ترکیب استاندارد گردید. در ترکیبات حاوی دی متیل آمین نتایج کاملاً متضادی مشاهده

گردید. ترکیب حاوی ۴-برومو-۲-متیل آنیلین بهترین اثر را نشان داد. جایگزینی متیل با گروه فلئور و یا انتقال فلئور به موقعیت متا حلقه آنیلین سبب کاهش معنی داری در اثرات سمیت سلولی شد. نتایج کلی این دسته نشان داد مشتقات آنیلین ۲،۴-دواستخلافی حاوی گروه الکترون دهنده اثرات بهتری را نسبت به ترکیبات ۲ و ۴-دواستخلافی و ۳-تک استخلافی حاوی گروه الکترون کشنده از خود نشان داد.

بررسی برهمکنش 8d به عنوان قوی‌ترین ترکیب سنتز شده و واندتانیب (داروی استاندارد) توسط مطالعات داکینگ مولکولی با محل اتصال ATP در بخش تیروزین کینازی EGFR و VEGFR-2 نشان داد که نیتروژن شماره ۱ کینازولین ترکیب 8d با Met769 محل اتصال ATP EGFR با انرژی اتصال ۸/۶- کیلوکالری بر مول، پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهد ($8d: 2.49 \text{ \AA}$). این پیوند برای قرارگیری مناسب هسته کینازولین در جایگاه فعال EGFR بسیار مهم است. واندتانیب این برهمکنش را نشان نداد و با انرژی پیوند ۸/۴- کیلوکالری بر مول به جایگاه فعال آنزیم متصل شد. ممکن است سیتوتوکسیسیتی بالاتر ترکیب 8d نسبت به واندتانیب به دلیل تشکیل همین پیوند و انرژی بالاتر پیوند باشد. همچنین، برهمکنش‌های آبگریز بین هر دو ترکیب و آمینو اسیدهای موجود در پاکت آبگریز جایگاه فعال EGFR مشاهده شد. این آمینو اسیدها شامل Val702، Ala719، Lys721، Met742، Leu764، Leu694، Leu768، Lys704 و Leu820 برای ترکیب 8d و Val702، Ala719، Lys721، Glu738، Met742، Leu694، Leu820 و Leu764 برای واندتانیب بودند. همچنین یک برهمکنش نامطلوب با Leu764 برای ترکیب 8d و Lys721 برای واندتانیب مشاهده شد. با توجه به تفاوت استخلاف‌های به کار رفته در ترکیب 8d و واندتانیب نوع برهمکنش‌ها در این دو ترکیب تفاوت‌هایی دارد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت‌های ساختاری و کانفورماسیون‌های مختلف در مطالعات داکینگ باشد. در سایر مطالعات که در منابع

آمده است نیز این تفاوت در نوع آمینواسیدهای برهمکنش دهنده دیده می‌شود (۸، ۵۰). مطالعات مختلفی برهمکنش‌های مشابهی را بین مهارکننده‌های تیروزین کیناز EGFR و محل اتصال ATP تیروزین کیناز EGFR گزارش کرده‌اند. در تمامی این مطالعات، پیوند هیدروژنی بین نیتروژن هتروسیکلیک و آمینو اسید کلیدی EGFR Met769، مهم‌ترین پیوند برای قرارگیری بهینه مهارکننده‌ها در جایگاه فعال EGFR است. علاوه بر این، برهمکنش‌های آبگریز با Leu694 و Leu820 و هم‌چنین برهمکنش کاتیون π با Lys721، گزارش شده است. هسته کینازولین هم‌چنین با اسیدهای آمینه Leu765، Ile719، Met769، Leu694 و Leu768 برهمکنش‌های آبگریز را نشان داده است. شایان ذکر است که حلقه آنیلین قرار گرفته در موقعیت ۴ حلقه کینازولین برهمکنش‌های آبگریز با Phe832، Leu764، Leu753، Met742، Ile720، Ile765 و هم‌چنین برهمکنش‌های قطبی با آمینو اسیدهای Thr830 و Thr766 را نشان داده است (۵۶ - ۵۱).

علاوه بر این، مطالعه برهمکنش ترکیب 8d و واندانیتیب با محل اتصال ATP VEGFR-2 تشکیل یک پیوند هیدروژنی بین نیتروژن‌های شماره ۱ حلقه کینازولین و Cys919 را نشان داد (، 8.8 kcal/mol، 8d: -8.4 kcal/mol، 2.80Å 2.71Å؛ Vandetanib: -8.4). هر دو ترکیب از طریق گروه ۴-برومو-۲-فلوئورو آنیلین برهمکنش‌های آبگریز را با یک پاکت آبگریز تشکیل شده توسط آمینو اسیدهای Val848، Ala866، Lys868، Thr916، Val899، Leu1035، Leu840 و Phe1047 را ایجاد کردند (تصویر شماره ۵). در راستای مطالعات دیگر، آمینو اسید Cys919 یک پیوند هیدروژنی حیاتی با نیتروژن حلقه‌های هتروسیکلیک مختلف، مانند کینازولین، پیریمیدین، ایندول و کینولون تشکیل می‌دهد. هم‌چنین، مهارکننده‌ها برهمکنش‌های دیگری را با جایگاه فعال VEGFR-2 نشان دادند، از جمله این برهمکنش‌ها می‌توان به برهمکنش π - π با Phe1047، برهمکنش کاتیون- π با Lys868 و بر

هم‌کنش‌های π -آلکیل با آمینو اسیدهای مختلف، مانند Leu840، Leu1035، Val916، Val848، Ala868، Val898، Phe918، Thr916 و Cys1045 اشاره کرد (۵۹ - ۵۷).

به دلیل نقش غیرقابل انکار مهاجرت سلولی در پیشرفت سرطان و متاستاز، بررسی مهاجرت سلولی برای مطالعه تاثیر ترکیبات 8d بر مهاجرت سلولی رده سلولی HUVEC انجام شد. نتایج نشان داد که ترکیب 8d قادر به جلوگیری از روند مهاجرت سلولی هستند. همان‌طور که در تصویر شماره ۶ نشان داده شده است، پس از تیمار سلول‌ها با ۵ میکرومولار از این ترکیب به مدت ۷۲ ساعت درصد بسته شدن خراش برای این ترکیب ۱۰ درصد خراش اولیه بود. در مقایسه با گروه کنترل که هیچ مهاری نشان نداد و ۱۰۰ درصد بسته شدن خراش را نشان داد، ترکیب فوق‌العاده اثرات بازدارندگی قابل توجهی بر مهاجرت سلولی داشت. مطالعات بر روی مشتقات هیبرید کینازولین-۴(3H)-اون و سولفاکلروپیریدازین نشان داد که ترکیب با یک گروه فن اتیل در موقعیت ۳ حلقه کینازولین دارای ترمیم خراش معادل ۵۸/۵۲ درصد در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل با ۹۹ درصد ترمیم خراش بود (۶۰). هم‌چنین مشتقات سنتز شده بنزو کسازول توسط Elkady و همکاران نشان دهنده کاهش معنی‌داری در ترمیم خراش در ترکیب با گروه‌های متوکسی و کلرو (۴۷/۲ درصد) در مقایسه با گروه شاهد (۹۵/۸۶ درصد) بود (۶۱). یک سری از مشتقات ۴-آنیلینو کینازولین طراحی و به عنوان ترکیبات با سمیت سلولی، با قرار دادن گروه‌های پیریدین و N-دی‌متیل آمین در موقعیت ۷ حلقه کینازولین، سنتز شدند. این ترکیبات بر روی دو رده سلولی سرطانی (A431 و HUVEC) و هم‌چنین یک رده سلولی سالم (HU02) با روش MTT تست شدند. نتایج طیف‌سنجی IR، NMR و Mass ساختار ترکیبات سنتز شده را تایید کرد. اکثر ترکیبات سنتز شده فعالیت سیتوتوکسیک قابل توجهی را بر روی رده‌های سلولی سرطانی به نسبت واندانیتیب نشان دادند، در

بیش تر و بهینه سازی ساختاری برای طراحی ترکیبات ضد سرطان جدید باشد.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گیلان جهت حمایت مالی صمیمانه سپاسگزاری می گردد. این اثر پژوهشی، مربوط به پایاننامه دانشجویان داروسازی آقای عبدالرحیم مختومی و آقای رامین بابایی در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی گیلان می باشد.

حالی که سمیت سلولی پائینی برای HU02 نشان دادند. لازم به ذکر است، ترکیب 8d بالاترین سمیت سلولی و شاخص انتخابی را بر روی هر دو رده سلولی سرطانی نشان داد. مطالعات داکینگ مولکولی تأیید کرد که ترکیب 8d نسبت به واندانایب انرژی اتصال بالاتری به EGFR و VEGFR-2 نشان می دهد. علاوه بر این، ترکیب 8d فعالیت بازدارندگی بالایی را در مهاجرت سلولی نشان داد. این یافته ها نشان می دهد که ترکیب 8d می تواند یک کاندید امیدوارکننده برای مطالعات

References

1. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141(7):1117-1134 PMID: 20602996.
2. Liao JJ-L. Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *J Med Chem* 2007; 50(3):409-424 PMID: 17266192.
3. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411(6835): 355-65.
4. Sheng Q, Liu J. The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(8): 1241-1245.
5. Wu X, Li M, Qu Y, Tang W, Zheng Y, Lian J, et al. Design and synthesis of novel gefitinib analogues with improved anti-tumor activity. *Bioorg Med Chem* 2010; 18(11): 3812-3822 PMID: 20466555.
6. Janmaat ML, Giaccone G. Small- molecule epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Oncologist* 2003; 8(6): 576-586 PMID: 14657536.
7. de Castro Barbosa ML, Lima LM, Tesch R, Sant'Anna CMR, Totzke F, Kubbutat MH, et al. Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014; 71: 1-14 PMID: 24269511.
8. Garofalo A, Goossens L, Lemoine A, Farce A, Arlot Y, Depreux P. Quinazoline-urea, new protein kinase inhibitors in treatment of prostate cancer. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2010; 25(2): 158-171 PMID: 20222760.
9. Garofalo A, Goossens L, Lemoine A, Ravez S, Six P, Howsam M, et al. [4-(6, 7-disubstituted quinazolin-4-ylamino) phenyl] carbamic acid esters: A novel series of dual egfr/vegfr-2 tyrosine kinase inhibitors. *Med Chem Comm* 2011; 2(1):65-72.
10. Chilin A, Conconi MT, Marzaro G, Guiotto A, Urbani L, Tonus F, et al. Exploring epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor features: The role of fused dioxygenated rings on the quinazoline scaffold. *J Med Chem* 2010; 53(4): 1862-1866 PMID: 20095624.
11. Antonello A, Tarozzi A, Morroni F, Cavalli A, Rosini M, Hrelia P, et al. Multitarget-directed drug design strategy: A novel molecule designed to block epidermal growth factor receptor (EGFR) and to exert proapoptotic effects. *J Med Chem* 2006; 49(23): 6642-6645 PMID: 17154492.
12. Pawar VG, Sos ML, Rode HB, Rabiller M, Heynck S, Van Otterlo WA, et al. Synthesis and biological evaluation of 4-

- anilinoquinolines as potent inhibitors of epidermal growth factor receptor. *J Med Chem* 2010; 53(7): 2892–2901.
13. Yu H, Li Y, Ge Y, Song Z, Wang C, Huang S, et al. Novel 4-anilinoquinazoline derivatives featuring an 1-adamantyl moiety as potent egfr inhibitors with enhanced activity against NSCLC cell lines. *Eur J Med Chem* 2016;110(3): 195-203 PMID: 26829280.
 14. Kim YS, Li F, O'Neill BE, Li Z. Specific binding of modified ZD6474 (vandetanib) monomer and its dimer with vegf receptor-2. *Bioconjug Chem* 2013; 24(11): 1937-1944 PMID: 24089699.
 15. Shi L, Wu TT, Wang Z, Xue JY, Xu YG. Discovery of quinazolin-4-amines bearing benzimidazole fragments as dual inhibitors of c-met and VEGFR-2. *Bioorg Med Chem* 2014; 22(17): 4735-4744 PMID: 25082515.
 16. Abou-Seri SM, Eldehna WM, Ali MM, Abou El Ella DA. 1-piperazinylphthalazines as potential VEGFR-2 inhibitors and anticancer agents: Synthesis and in vitro biological evaluation. *Eur J Med Chem* 2016; 107: 165-179 PMID: 26590508.
 17. Hasegawa M, Nishigaki N, Washio Y, Kano K, Harris PA, Sato H, et al. Discovery of novel benzimidazoles as potent inhibitors of TIE-2 and VEGFR-2 tyrosine kinase receptors. *J Med Chem* 2007; 50(18): 4453-4470 PMID: 17676829.
 18. Wissner A, Fraser HL, Ingalls CL, Dushin RG, Floyd MB, Cheung K, et al. Dual irreversible kinase inhibitors: Quinazoline-based inhibitors incorporating two independent reactive centers with each targeting different cysteine residues in the kinase domains of EGFR and VEGFR-2. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(11): 3635-3648 PMID: 17416531.
 19. Xi L, Zhang JQ, Liu ZC, Zhang JH, Yan JF, Jin Y, et al. Novel 5-anilinoquinazoline-8-nitro derivatives as inhibitors of VEGFR-2 tyrosine kinase: Synthesis, biological evaluation and molecular docking. *Org Biomol Chem* 2013;11(26):4367-4378 PMID: 23715382.
 20. Garofalo A, Goossens L, Six P, Lemoine A, Ravez S, Farce A, et al. Impact of aryloxy-linked quinazolines: A novel series of selective VEGFR-2 receptor tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(7): 2106-2112 PMID: 21353546.
 21. Mohammed AH, Gomaa RM, El-Sayed MAA, Selim KB. Synthesis, antitumor activities, and molecular modeling of 4-anilinoquinazoline derivatives as EGFR-TK inhibitors. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2023; 57(8):1215-1229.
 22. Xu P, Chu J, Li Y, Wang Y, He Y, Qi C, et al. Novel promising 4-anilinoquinazoline-based derivatives as multi-target RTKs inhibitors: Design, molecular docking, synthesis, and antitumor activities in vitro and vivo. *Bioorg Med Chem* 2019; 27(20): 114938 PMID: 31488358.
 23. Ismail RS, Abou-Seri SM, Eldehna WM, Ismail NS, Elgazwi SM, Ghabbour HA, et al. Novel series of 6-(2-substitutedacetamido)-4-anilinoquinazolines as EGFR-ERK signal transduction inhibitors in MCF-7 breast cancer cells. *Eur J Med Chem* 2018; 155: 782-796 PMID: 30047410.
 24. Wei H, Duan Y, Gou W, Cui J, Ning H, Li D, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-anilinoquinazoline derivatives as hypoxia-selective EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors. *Eur J Med Chem* 2019; 181: 111552 PMID: 31387063.

25. Dou D, Wang J, Qiao Y, Wumaier G, Sha W, Li W, et al. Discovery and optimization of 4-anilinoquinazoline derivatives spanning atp binding site and allosteric site as effective EGFR-c797s inhibitors. *Eur J Med Chem* 2022; 244: 114856 PMID: 36279692.
26. Hennequin LF, Stokes ES, Thomas AP, Johnstone C, Plé PA, Ogilvie DJ, et al. Novel 4-anilinoquinazolines with C-7 basic side chains: Design and structure activity relationship of a series of potent, orally active, VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 2002; 45(6): 1300-1312 PMID: 11881999.
27. Hennequin LF, Thomas AP, Johnstone C, Stokes ES, Plé PA, Lohmann J-JM, et al. Design and structure–activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 1999; 42(26): 5369-5389 PMID: 10639280.
28. Zhang HQ, Gong FH, Li CG, Zhang C, Wang YJ, Xu YG, et al. Design and discovery of 4-anilinoquinazoline-acylamino derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual tk inhibitors. *Eur J Med Chem* 2016; 109: 371-379.
29. Alagawani S, Vasilyev V, Clayton AH, Wang F. Insights into halogen-induced changes in 4-anilinoquinazoline EGFR inhibitors: A computational spectroscopic study. *Molecules* 2024; 29(12): 2800 PMID: 38930865.
30. Yousefbeyk F, Ghasemi S. A review of quinazoline-based EGFR/VEGFR-2 dual inhibitors as potent anticancer agents: Structure-activity relationship and docking studies. *Pharm Sci* 2025; 31(1):43-64.
31. Azmian Moghadam F, Kefayati H, Evazalipour M, Ghasemi S. Design, synthesis, biological evaluation, and docking study of novel 4-anilinoquinazolines derivatives as anticancer agents. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 2022; 41(2): 353-367.
32. Moghadam FA, Evazalipour M, Kefayati H, Ghasemi S. 6,7-disubstituted-4-anilinoquinazoline: Design, synthesis and anticancer activity as a novel series of potent anticancer agents. *Pharm Sci* 2021; 27(2): 209-218.
33. Zhao F, Lin Z, Wang F, Zhao W, Dong X. Four-membered heterocycles-containing 4-anilino-quinazoline derivatives as epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2013; 23(19): 5385-5388 PMID: 23973168.
34. Ghasemi S, Sharifi S, Mojarad JS. Design, synthesis and biological evaluation of novel piperazinone derivatives as cytotoxic agents. *Adv Pharm Bull* 2020; 10(3): 423-429.
35. Holladay MW, Campbell BT, Rowbottom MW, Chao Q, Sprankle KG, Lai AG, et al. 4-quinazolinyl-oxy-diaryl ureas as novel brafv600e inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2011; 21(18): 5342-5346 PMID: 21807507.
36. Mozaffari S, Ghasemi S, Baher H, Khademi H, Amini M, Sakhteman A, et al. Synthesis and evaluation of some novel methylene-bridged aryl semicarbazones as potential anticonvulsant agents. *Medicinal Chemistry Research* 2012; 21(11): 3797-3808.
37. Zhang N, Wu B, Powell D, Wissner A, Floyd MB, Kovacs ED, et al. Synthesis and structure–activity relationships of 3-cyano-4-(phenoxyanilino) quinolines as mek (MAPKK) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10(24): 2825-2828 PMID: 11133101.
38. Zhang Y, Gao H, Liu R, Liu J, Chen L, Li X, et al. Quinazoline-1-deoxynojirimycin

- hybrids as high active dual inhibitors of egfr and α -glucosidase. *Bioorg Med Chem Lett* 2017; 27(18): 4309-4313 PMID: 28838691.
39. Moghadam FA, Dabirian S, Tavani AE, Alipour P, Mojabi M, Evazalipour M, et al. Application of a deep eutectic solvent for the synthesis of novel imidazole-containing quinazoline derivatives as potent cytotoxic agents. *Pharm Sci* 2024; 30(2): 215-228.
 40. Yousefbeyk F, Hemmati G, Gholipour Z, Ghasemi S, Evazalipour M, Schubert C, et al. Phytochemical analysis, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of golden chamomile (*matricaria aurea* (loefl.) schultz bip). *Z Naturforsch C J Biosci* 2022; 77(7-8): 331-342 PMID: 35231163.
 41. Robichaux JP, Elamin YY, Tan Z, Carter BW, Zhang S, Liu S, et al. Mechanisms and clinical activity of an egfr and her2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nat Med* 2018; 24(5): 638-646 PMID: 29686424.
 42. Cheng W-Y, Chiao M-T, Liang Y-J, Yang Y-C, Shen C-C, Yang C-Y. Luteolin inhibits migration of human glioblastoma u-87 mg and t98g cells through downregulation of CDC42 expression and pi3k/AKT activity. *Molecular biology reports* 2013;40(9):5315-26.
 43. Shen F-Q, Shi L, Wang Z-F, Wang C-R, Chen J-J, Liu Y, et al. Design, synthesis, biological evaluation of benzoyl amide derivatives containing nitrogen heterocyclic ring as potential VEGFR-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2019; 27(17): 3813-3824 PMID: 31327679.
 44. Garofalo A, Farce A, Ravez Sv, Lemoine Al, Six P, Chavatte P, et al. Synthesis and structure-activity relationships of (aryloxy) quinazoline ureas as novel, potent, and selective vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitors. *J Med Chem* 2012; 55(3): 1189-1204 PMID: 22229669.
 45. Chen L, Zhang Y, Liu J, Wang W, Li X, Zhao L, et al. Novel 4-arylaminoquinazoline derivatives with (e)-propen-1-yl moiety as potent EGFR inhibitors with enhanced antiproliferative activities against tumor cells. *Eur J Med Chem* 2017; 138: 689-697.
 46. Zhang Y, Chen Y, Zhang D, Wang L, Lu T, Jiao Y. Discovery of novel potent VEGFR-2 inhibitors exerting significant antiproliferative activity against cancer cell lines. *J Med Chem* 2018; 61(1): 140-157 PMID: 29189002.
 47. Ravez S, Barczyk A, Six P, Cagnon A, Garofalo A, Goossens L, et al. Inhibition of tumor cell growth and angiogenesis by 7-aminoalkoxy-4-aryloxy-quinazoline ureas, a novel series of multi-tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* 2014;79:369-381 PMID: 24747748.
 48. Elsayed NM, Serya RA, Tolba MF, Ahmed M, Barakat K, Abou El Ella DA, et al. Design, synthesis, biological evaluation and dynamics simulation of indazole derivatives with antiangiogenic and antiproliferative anticancer activity. *Bioorg Chem* 2019;82: 340-359 PMID: 30428414.
 49. Yousefbeyk F, Ghasemi S, Evazalipour M, Dabirian S, Schubert C, Hekmatnia S, et al. Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of leaves and roots of *rubus hyrcanus* juz. *European Food Research and Technology* 2022; 248(1): 141-152.
 50. Ghorab MM, Soliman AM, El-Adl K, Hanafy NS. New quinazoline sulfonamide derivatives as

- potential anticancer agents: Identifying a promising hit with dual EGFR/VEGFR-2 inhibitory and radiosensitizing activity. *Bioorg Chem* 2023; 140: 106791 PMID: 37611529.
51. Sangande F, Julianti E, Tjahjono DH. Ligand-based pharmacophore modeling, molecular docking, and molecular dynamic studies of dual tyrosine kinase inhibitor of EGFR and VEGFR2. *Int J Mol Sci* 2020; 21(20):7779.
 52. Nasab RR, Mansourian M, Hassanzadeh F, Shahlaei M. Exploring the interaction between epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and some of the synthesized inhibitors using combination of in-silico and in-vitro cytotoxicity methods. *Res Pharm Sci* 2018;13(6):509-522 PMID: 30607149.
 53. Al-Warhi T, El Kerdawy AM, Said MA, Albohy A, Elsayed ZM, Aljaeed N, et al. Novel 2-(5-aryl-4,5-dihydropyrazol-1-yl) thiazol-4-one as EGFR inhibitors: Synthesis, biological assessment and molecular docking insights. *Drug Des Devel Ther* 2022; 16: 1457-1471
 54. Verma G, Khan MF, Akhtar W, Alam MM, Akhter M, Alam O, et al. Pharmacophore modeling, 3d-QSAR, docking and adme prediction of quinazoline based egfr inhibitors. *Arabian Journal of Chemistry* 2019;12(8):4815-4839.
 55. Thirumurugan K, Lakshmanan S, Govindaraj D, Prabu DSD, Ramalakshmi N, Antony SA. Design, synthesis and anti-inflammatory activity of pyrimidine scaffold benzamide derivatives as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Molecular Structure* 2018; 1171: 541-550.
 56. Choowongkamon K, Sawatdichaikul O, Songtawee N, Limtrakul J. Receptor-based virtual screening of egfr kinase inhibitors from the NCI diversity database. *Molecules* 2010; 15(6):4041-4054.
 57. Meng F. Molecular dynamics simulation of VEGFR2 with sorafenib and other urea- substituted aryloxy compounds. *Journal of Theoretical Chemistry* 2013; 739574: 1-7.
 58. Marzouk AA, Abdel-Aziz SA, Abdelrahman KS, Wanas AS, Gouda AM, Youssif BG, et al. Design and synthesis of new 1, 6-dihydropyrimidin-2-thio derivatives targeting VEGFR-2: Molecular docking and antiproliferative evaluation. *Bioorg Chem* 2020; 102: 104090 PMID: 32683176.
 59. Kang D, Pang X, Lian W, Xu L, Wang J, Jia H, et al. Discovery of vegfr2 inhibitors by integrating naïve bayesian classification, molecular docking and drug screening approaches. *RSC advances* 2018; 8(10): 5286-5297.
 60. Zahran SS, Ragab FA, El-Gazzar MG, Soliman AM, Mahmoud WR, Ghorab MM. Antiproliferative, antiangiogenic and apoptotic effect of new hybrids of quinazoline-4 (3H)-ones and sulfachloropyridazine. *Eur J Med Chem* 2023; 245: 114912 PMID: 36395650.
 61. Elkady H, Elwan A, El-Mahdy HA, Doghish AS, Ismail A, Taghour MS, et al. New benzoxazole derivatives as potential VEGFR-2 inhibitors and apoptosis inducers: Design, synthesis, anti-proliferative evaluation, flowcytometric analysis, and in silico studies. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2022; 37(1): 403-416.