



การสังเคราะห์และการประเมินผลทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 และ Huh7 ของโมเลกุล
เลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลีนาไมด์ของซอราเฟนิบ



โดย
นายโยธิน มาตะโก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2562

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร



การสังเคราะห์และการประเมินผลทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 และ Huh7 ของ
โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลีนาไมด์ของซอราเฟนิบ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION TOWARDS HEPG2 AND HUH7 CELL
LINES OF 1,2,3-TRIAZOLE-CONTAINING SORAFENIB ANALOGUES : THE
REPLACEMENT OF PICOLINAMIDE RING OF SORAFENIB.



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (CHEMISTRY)
Department of CHEMISTRY
Graduate School, Silpakorn University
Academic Year 2019
Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ การสังเคราะห์และการประเมินผลทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งระดับ
HepG2 และ Huh7 ของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่
1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลินาไมด์ของซอราเฟนิบ

โดย โยธิน มาตะโก

สาขาวิชา เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญาโทบริหารธุรกิจ

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

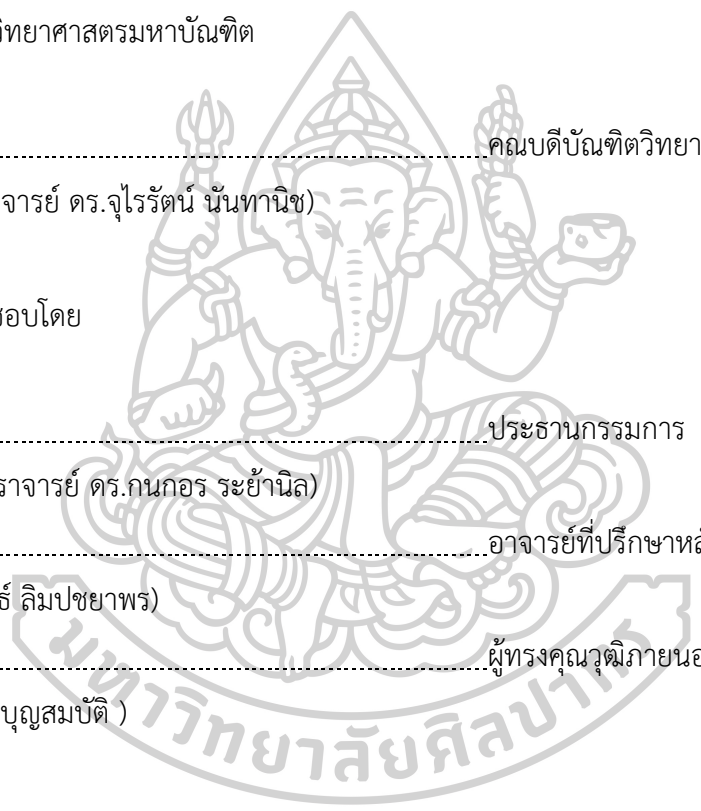
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกอร ระย้านิล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร.จุฑาทิพ บุญสมบัติ)



59317203 : เคมี แผน ก แบบ ก 2 ปริญญามหาบัณฑิต

คำสำคัญ : ตัวยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มไคเนส, ไตรเอโซล, เซลล์มะเร็งตับ, โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ, ยารักษามะเร็งแบบมุ่งเป้า

นาย โยธิน มาตะโก: การสังเคราะห์และการประเมินผลทางชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 ของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลินาไมด์ของซอราเฟนิบ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ดร. ภาณุพันธ์ ลิ้มชยาพร

ซอราเฟนิบ (1) เป็นยาต้านมะเร็งที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of USA, FDA) ให้ใช้รักษามะเร็งตับในระยะลุกลามตั้งแต่ปี 2005 แต่ยังมีผลข้างเคียงหลายประการและมีข้อจำกัดทางสมบัติทางเภสัช อีกทั้งการรักษาด้วยซอราเฟนิบยังมีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ งานวิจัยนี้มุ่งพัฒนาให้มีประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับเพิ่มขึ้น โดยการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่แทนที่วงพิโคลินาไมด์ด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซลที่ต่อกับเบนซีนทั้งหมด 18 โมเลกุล (4b-4s) ทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งตับ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์การยับยั้ง โดยสามารถสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบได้สำเร็จ ผ่านปฏิกิริยาไดเอโซไทเซชัน การแทนที่ ฮุซเคน 1,3-ไดโพลาร์โซโคลแอตดิชัน เป็นหลัก โดยมีผลผลิตรวมร้อยละดีถึงดีมาก จากการทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 (นำผลการทดสอบฤทธิ์ของโมเลกุลเลียนแบบจำนวน 13 โมเลกุล (15a-15m) มาจากวิทยานิพนธ์ของ น.ส.ชนิกานต์ เอี่ยมสอาด, 2562, มาร่วมศึกษาด้วย)⁴¹ พบว่าโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่ไม่มีหมู่แทนที่ (R=H; 4b) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับทั้ง 2 เซลล์ ($IC_{50} > 50 \mu M$) แต่เมื่อใส่หมู่แทนที่พบว่าโมเลกุลเลียนแบบมีฤทธิ์เพิ่มขึ้น สำหรับโมเลกุลส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์นั้น จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง Huh7 มากกว่า HepG2 และการแทนที่ของหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง *ortho* จะมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าตำแหน่ง *meta* และ *para* ตามลำดับ โดยโมเลกุล 15e (*o*-CN) และ 15j (*m*-NH₂) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 ด้วย $IC_{50} = 3.191 \mu M$ และ $3.588 \mu M$ ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับยาซอราเฟนิบ ($IC_{50} = 3.871 \mu M$) และโมเลกุล 15a (*o*-Cl) และ 15k (*o*-NHAc) มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ Huh7 ด้วย $IC_{50} = 1.011 \mu M$ และ $1.197 \mu M$ ดีกว่ายาซอราเฟนิบ ($IC_{50} = 2.930 \mu M$) ซึ่งดีกว่าประมาณ 2.9 และ 2.5 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้โมเลกุล 15g (*o*-NO₂) มีศักยภาพในการยับยั้งที่ดีกับเซลล์มะเร็งตับทั้งสองชนิดด้วย โดยมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 และ Huh7 ด้วย $IC_{50} = 3.734 \mu M$ และ $1.632 \mu M$ ซึ่งเทียบเท่าและดีกว่าซอราเฟนิบประมาณ 1.8 เท่า ตามลำดับ



59317203 : Major (CHEMISTRY)

Keyword : sorafenib analogue, multikinase inhibitor, triazole, targeted cancer drug, liver cancer cell line

MR. YOTIN MATAKO : SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION TOWARDS HEPG2 AND HUH7 CELL LINES OF 1,2,3-TRIAZOLE-CONTAINING SORAFENIB ANALOGUES : THE REPLACEMENT OF PICOLINAMIDE RING OF SORAFENIB. THESIS ADVISOR : PANUPUN LIMPACHAYAPORN, Ph.D.

Sorafenib (1) is the first oral drug approved by Food and Drug Administration of USA (US FDA) in 2005 for treatment of advanced HCC. However, sorafenib possesses unexpected adverse effects and limitation of pharmacological properties. Even the patients are treated with sorafenib, the survival rate is still low. Herein, we aim to improve cytotoxicity of drug against liver cancer cell lines. Thus, the structure of sorafenib was modified by replacement of the picolinamide ring with 1,2,3-triazole connecting with a substituted benzene. Totally, 18 novel 1,2,3-triazole-containing Sorafenib derivatives (4b-4s) were prepared successfully *via* diazotization, substitution and Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition with good to excellent yields. The inhibitory evaluation towards HepG2 and Huh7 of the 18 synthetic analogues and 13 analogues (15a-15m) from Chanikarn Eamsaard's studies (2019)⁴¹ revealed that unsubstituted compound (R = H; 4b) was inactive ($IC_{50} > 50$) for both cell lines, whereas the analogues with substituted benzene ring significantly improved the activities. For the potent inhibitors, they inhibited Huh7 more efficiently than HepG2. Substitution at *ortho*-position with various groups on the benzene ring adjacent to triazole exhibited superior inhibitory activities than substitution at *meta*- and *para*-positions, respectively. Compounds 14e (*o*-CN) and 14j (*m*-NH₂) showed inhibitory property towards HepG2 with $IC_{50} = 3.191 \mu\text{M}$ and $3.588 \mu\text{M}$, similar to sorafenib ($IC_{50} = 3.871 \mu\text{M}$). For Huh7 inhibition, analogues 14a (*o*-Cl) and 14k (*o*-NHAc) possessed the best cytotoxicity against Huh7 with $IC_{50} = 1.011 \mu\text{M}$ and $1.197 \mu\text{M}$, which were ca. 2.9 and 2.5-fold better than sorafenib ($IC_{50} = 2.930 \mu\text{M}$), respectively. Furthermore, compound 15g (*o*-NO₂) was a potent inhibitor for both HepG2 and Huh7 with $IC_{50} = 3.734 \mu\text{M}$ and $1.632 \mu\text{M}$, respectively, which were as active as sorafenib towards

HepG2 and 1.8-fold superior to sorafenib towards Huh7.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.ภาณุพันธ์ ลิ้มปชยาพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่มอบความรู้ แนวความคิด คำแนะนำ พร้อมทั้งตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.คมสันต์ สุทธิสินทอง ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วมวิทยานิพนธ์ ที่มอบคำแนะนำ ความรู้ พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ นพ.พิสิฐ ตั้งกิจวานิชย์ ดร. ณัฐธยาน์ ช่วยเพ็ญและ นางสาวยุวภรณ์ เกตุแก้ว ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านโรคมะเร็งตับอีกเสบและมะเร็งตับ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 และ Huh7

ขอขอบคุณ ดร. จุฑาทิพ บุญสมบัติ ห้องปฏิบัติการผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย รวมทั้งมอบความอนุเคราะห์ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งระดับ (HepG2) เบื้องต้น เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) นอกจากนี้ยังให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งมอบคำแนะนำต่าง ๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ นอกจากนี้ขอขอบคุณคุณสมคิด สิทธิมนต์ชัย คุณผกาภาส อินทโชติ คุณสุชาติ เสี่ยงใส และคุณบุษกร ทราชมณี จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง

ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกอร ระย้านิล ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งมอบคำแนะนำต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณนักวิจัยที่ปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ดี

ขอขอบคุณทุนวิจัยสำหรับบัณฑิต พสวท. แรกบรรจุ สัญญาเลขที่ 19/2558 และภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สำหรับงบประมาณ วัสดุ และเครื่องมือในการดำเนินการวิจัย และการสนับสนุนทุนการศึกษาของนายโยธิน มาตะโก รหัสผู้รับทุน TG-55-16-59-034M จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติตามสัญญาสนับสนุนทุนสนับสนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology; TGIST) เลขที่ SCA-CO-2559-2316-TH

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยให้

คำปรึกษาและความช่วยเหลือ ตลอดจนการอำนวยความสะดวกทั้งด้านอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้
ในการทำวิทยานิพนธ์

โยธิน มาตะโก



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ญ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
สมมติฐานของการศึกษา.....	3
บทที่ 2	5
ข้อมูลเกี่ยวกับชอราเฟนิบและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	5
ข้อมูลเกี่ยวกับชอราเฟนิบ.....	5
วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	8
บทที่ 3	23
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	23
แนวคิดการออกแบบโมเลกุล.....	23
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง.....	56
บทที่ 4	58
ผลการทดลอง	58
การศึกษาเส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย 4a.....	58
การสังเคราะห์อนุพันธ์ฟีนีลเอไซด์.....	61

การสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบเป้าหมาย 4b-4s.....	62
ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับและความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (SARs).....	64
บทที่ 5	70
สรุปผลการทดลอง.....	70
ภาคผนวก.....	71
รายการอ้างอิง	203
ประวัติผู้เขียน.....	209

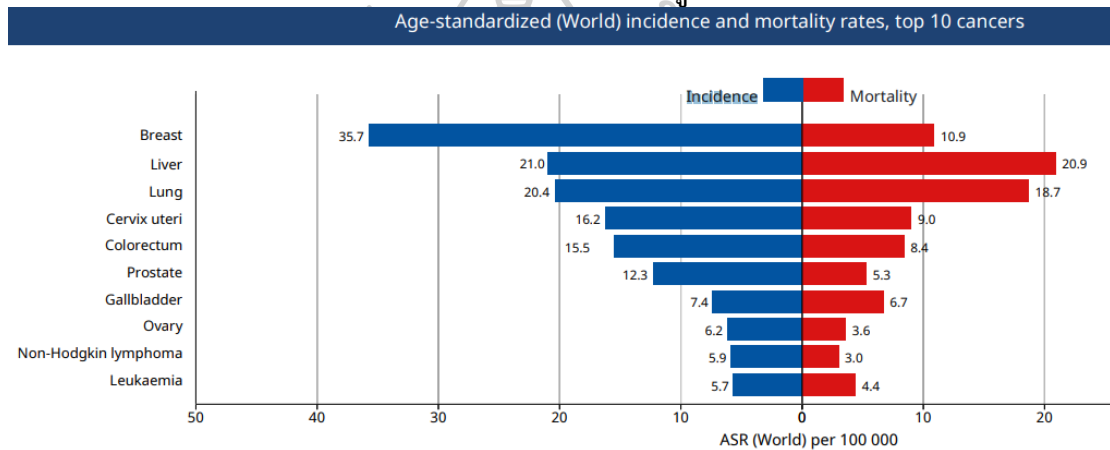


บทที่ 1

บทนำ

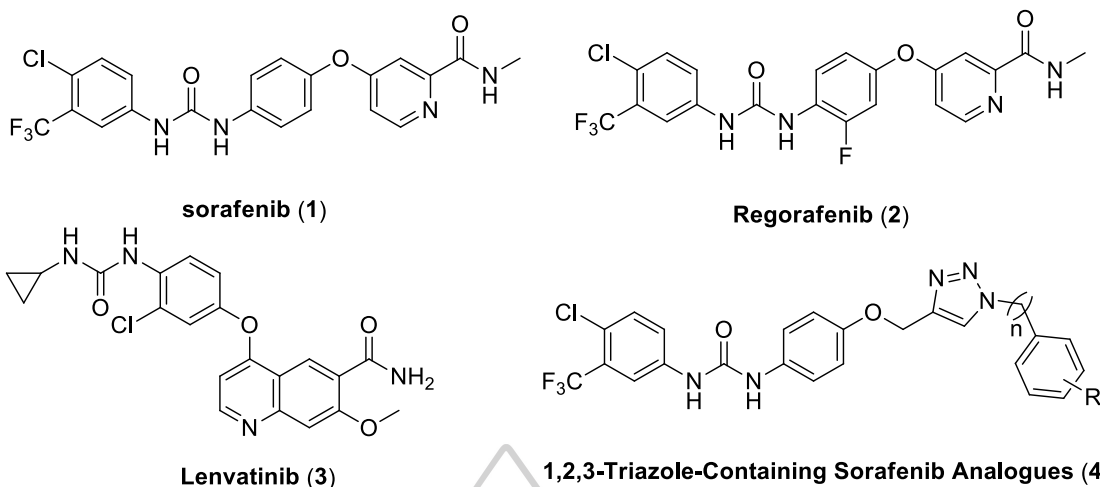
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปี 2562 องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) รายงานว่ามะเร็งที่พบมากที่สุดในประเทศไทยคือมะเร็งปอด (14.1%) รองลงมาเป็นมะเร็งตับ (13.7%) มะเร็งเต้านม (11.4%) และมะเร็งลำไส้ (10.6%) ตามลำดับ แต่มะเร็งตับมีอัตราการเสียชีวิตที่สูงที่สุด โดยสูงถึง 99.4% ซึ่งมากกว่ามะเร็งอีก 3 ชนิด คือมะเร็งปอด มะเร็งเต้านม และมะเร็งลำไส้ ที่มีอัตราการเสียชีวิต 89.2% 30.3% และ 56.6% ตามลำดับ¹ ดังแสดงในรูปภาพที่ 1



รูปภาพที่ 1 อัตราอุบัติการณ์ปรับอายุ (age-standardized incidence rate, ASR) ของอัตราอุบัติการณ์¹

มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma หรือ HCC) เป็นมะเร็งที่พบได้ทั่วโลก โดยเฉพาะประเทศในเขตร้อนขึ้นรวมถึงประเทศไทย โดยปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ เช่น การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซีเรื้อรัง (พบว่าร้อยละ 90 ของผู้ป่วยมะเร็งตับมีการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบีและซีมาก่อน) การดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณมาก การรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) และผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็ง² การตรวจวินิจฉัยโรคนี้นั้นในระยะเริ่มต้นสามารถทำได้ 3 วิธี ดังนี้ 1. การตรวจหาระดับแอลฟาฟิโตโปรตีนในเลือด 2. การใช้เครื่องมือพิเศษ เช่น เครื่องอัลตราซาวด์ และเครื่องเอกซเรย์คอมพิวเตอร์ เป็นต้น 3. การดูลักษณะของเซลล์ด้วยการเจาะเอาเนื้อตับมาตรวจเพื่อวินิจฉัย² ปัจจุบันการรักษามะเร็งตับสามารถทำได้หลายวิธีตามความเหมาะสม ได้แก่ การผ่าตัด การฉีดยาที่ก้อนมะเร็งตับโดยตรง การฉีดยาหรือสารอุดตันที่หลอดเลือดแดงที่ไปหล่อเลี้ยงมะเร็งตับ และยารักษามะเร็งตับแบบจำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง (targeted cancer drug)² ซึ่งในปัจจุบันมียาที่ได้รับการรับรองจาก FDA (Food and Drug administration of USA) ทั้งหมด 3 ตัวคือยาซอราเฟนิบ (Sorafenib; 1) ยาเรโกราเฟนิบ (Regorafenib; 2) และยาเลนาวาทีนิบ (Lenvatinib; 3)^{3, 4} โดยมีโครงสร้างทางเคมีดังรูปภาพที่ 2



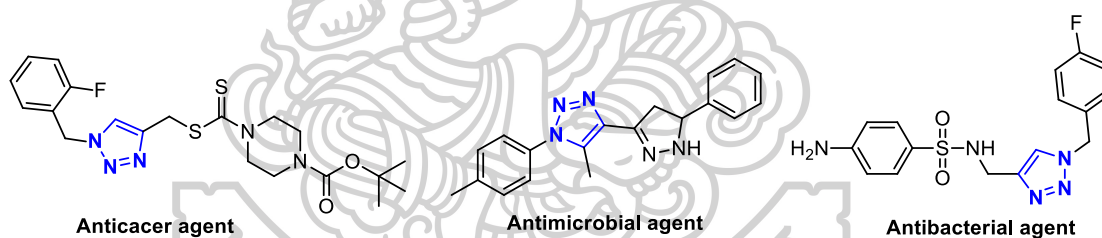
รูปภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของซอร์afenิบ (1), เรโกราเฟนิบ (2) เล็นวาทีนิบ (3) และโมเลกุลเลียนแบบซอร์afenิบที่แทนที่วงพิโคลินาไมด์ของซอร์afenิบด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซล (4)^{3, 4}

โครงสร้างของยาทั้ง 3 ตัวประกอบไปด้วย 4 ลักษณะที่สำคัญคือ 1) วงแหวนที่ไม่มีขั้ว 2) หมู่ยูเรีย (urea) 3) วงฟีนอกซี (phenoxy) และ 4) วงอะโรมาติกที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน (H-Bond) และอันตรกิริยาแบบไพ-ไพ (π - π interaction) ได้ ถึงแม้ว่ายาทั้ง 3 ตัวจะมีข้อดีหลายประการ แต่ก็ยังมีปัจจัยจำกัด เช่น ยามีราคาสูงทำให้ผู้ป่วยทั่วไปไม่สามารถเข้าถึงการรักษาด้วยยาเหล่านี้ได้และผลข้างเคียงอีกหลายประการ นอกจากนี้ซอร์afenิบเป็นยาตัวแรกที่ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug administration of USA, FDA) ใช้ในการรักษามะเร็งตับในระยะลุกลาม (advanced hepatocellular carcinoma; HCC) ได้ตั้งแต่ปี 2550⁵ และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มไคเนส (multikinase)⁶ ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้นักเคมีทางการแพทย์ สนใจออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ซอร์afenิบเป็นจำนวนมาก เพื่อลดผลข้างเคียงของยา พัฒนาสมบัติทางเภสัช (pharmacological properties) ให้มีความเหมาะสมมากขึ้นและพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับที่ต่ำกว่าซอร์afenิบ อีกทั้งได้นำโมเลกุลเลียนแบบไปทดสอบกับมะเร็งชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในงานวิจัยก่อนหน้า ผู้วิจัยได้รายงานการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอร์afenิบ รวมถึงผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งต่างๆ จำนวนมาก เช่น การแปรเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ (phenyl halide) พบว่า 3-CF₃, 4-Cl-disubstituted บนวงฟีนิลมีความสำคัญต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)⁷⁻⁹ การเปลี่ยนจากหมู่ยูเรียเป็นหมู่ไธโอยูเรีย (thiourea), เบนซิลยูเรีย (benzyl urea) หรือ chalcone ทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลง^{7, 10, 11} การเปลี่ยนจากหมู่อีเทอร์ (ether) เป็นหมู่ไธโออีเทอร์ (thioether) ทำให้ฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116), มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) เพิ่มขึ้น และการแทนที่พิโคลินาไมด์ (picolinamide) ด้วยเฮเทอโรไซเคิลต่างๆ (heterocycle) เช่น วงแหวนนิโคตินาไมด์ (nicotinamide) ไพราซีน (pyrazine) ควินาโซลีน (quinazoline) ควินาซาไลน์ไดโอน (quinazalinedione) เป็นต้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116),

เซลล์มะเร็งผิวหนัง (B16) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด¹²⁻¹⁵

จากงานวิจัยก่อนหน้าที่กล่าวข้างต้น ชี้ให้เห็นว่าการคงอยู่ของวงพินิลเฮไลด์ หมูยูเรีย และวงพินอกซี มีความสำคัญต่อความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยเฉพาะการแทนที่พิโคลิनाไมด์ (picolinamide) ด้วยเฮทเทอโรไซเคิลต่างๆ ทำให้โมเลกุลเลียนแบบมีศักยภาพเพิ่มขึ้น ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงช่วยสนับสนุนการแทนที่วงพิโคลิनाไมด์ของซอราเฟนิบด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซล ดังโมเลกุลที่ออกแบบ 4 (รูปภาพที่ 2) จะทำให้โมเลกุลเลียนแบบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับหรือเซลล์มะเร็งชนิดอื่นเพิ่มขึ้น โดยวง 1,2,3-ไตรเอโซลสามารถเกิดอันตรกิริยาแบบไพ-ไพ (π - π interaction) กับบริเวณเร่ง (active site) เหมือนกับวงอะโรมาติกในงานวิจัยก่อนหน้า นอกจากนี้วง 1,2,3-ไตรเอโซลสามารถเพิ่มอันตรกิริยาแบบไฮโดรฟิลิก (hydrophilic interaction), พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond), ความคล้ายกับกรดอะมิโนธรรมชาติฮิสทีดีน (Histidine), มีความเสถียรต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ด้านแบคทีเรีย (antibacterial activity), ต้านมะเร็ง (anticancer activity) เป็นต้น¹⁶ ดังแสดงตัวอย่างในรูปภาพที่ 3 นอกจากนี้ผู้วิจัยคาดว่าวงเบนซีนที่ติดกับวง 1,2,3-ไตรเอโซล สามารถเพิ่มอันตรกิริยาแบบไฮโดรฟิลิก/ไฮโดรโฟบิก (hydrophilic/hydrophobic interaction), อันตรกิริยาแบบไพ-ไพ (π - π interaction), พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) หรือความเกะกะ (steric) กับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้อีกด้วย



รูปภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของยาที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซลเป็นองค์ประกอบ¹⁶

ซึ่งในปัจจุบันนักเคมีทางการแพทย์ สนใจออกแบบและสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบเป็นจำนวนมากแต่ไม่ได้มุ่งทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 และ Huh7) มากนัก ในงานวิจัยนี้สนใจที่จะสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลิनाไมด์ของซอราเฟนิบ เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 และ Huh7)

ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาและเลือกเส้นทางที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย
2. ออกแบบโครงสร้างและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ
3. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ และศึกษาความสัมพันธ์ทางโครงสร้างและฤทธิ์ยับยั้ง

สมมติฐานของการศึกษา

ซอราเฟนิบเป็นยาตัวแรกที่ใช้ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับในระยะลุกลาม (advanced hepatocellular carcinoma หรือ HCC) อีกทั้งยาซอราเฟนิบสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดใน

กลุ่มไคเนส (multikinase)⁶ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นโมเลกุลต้นแบบในการพัฒนายา ต่อมา ผู้วิจัยคิดว่าถ้ามีการเปลี่ยนจากหมู่พิโคลินาไมด์ (picolinamide) เป็นวง 1,2,3-ไตรเอโซล (triazole) คาดว่าจะทำให้ยามีฤทธิ์ที่ดีขึ้นเพราะวง 1,2,3-ไตรเอโซลมีข้อดีหลายประการดังนี้ เช่น มีความคล้ายกับกรดอะมิโนฮิสทีดิน (Histidine amino acid) มีความเสถียรต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม สามารถสร้างอันตรกิริยาแบบไพ-ไพ (π - π interaction) และพันธะไฮโดรเจนได้ และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย¹⁶ โดยคาดว่าโมเลกุลเลียนแบบในงานวิจัยนี้จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 และ Huh7 เพิ่มขึ้นหรืออาจจะมีเฉพาะต่อเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดเพิ่มมากขึ้น

ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาและเลือกเส้นทางที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ (Sorafenib) ที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซล (1,2,3-triazole) เป็นองค์ประกอบ
2. สังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ (Sorafenib) ที่แทนที่หมู่พิโคลินาไมด์ (picolinamide) ด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซลที่ต่อกับวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้จากโมเลกุลแอลไคน์ (alkyne) และเอไซด์ (azide) ผ่านปฏิกิริยา Click reaction
3. นำโมเลกุลเป้าหมายที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 และ Huh7 โดยทำการ screening ที่ความเข้มข้น 50 μ M (cut off)
4. หลังจากการทำ screening ที่ความเข้มข้น 50 μ M ถ้าพบว่ามีโมเลกุลมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้มากกว่าร้อยละ 50 จะนำโมเลกุลดังกล่าวไปทดสอบหาค่าที่ละเอียดขึ้น คือค่า IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) โดยค่าดังกล่าวสามารถหาด้วยเทคนิค MTT assay

บทที่ 2

ข้อมูลเกี่ยวกับซอราเฟนิบและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลเกี่ยวกับซอราเฟนิบ

ยาซอราเฟนิบ มีชื่อทางการค้าว่า Nexavar® เป็นยาทานตัวแรกที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มไคเนส (multikinase inhibitor) ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนและการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma หรือ HCC) ในระยะลุกลาม นอกจากนี้ซอราเฟนิบสามารถใช้ในรักษาผู้ป่วยมะเร็งไตระยะลุกลาม (advanced renal cell carcinoma; RCC)¹¹ และมะเร็งต่อมไทรอยด์ (thyroid cancer)¹⁷ ได้อีกด้วย ซอราเฟนิบสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มไคเนส (oral drug multikinase) โดยเอนไซม์ไคเนสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (cell signaling) การแบ่งตัว (proliferation) การสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็ง¹¹ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ยาซอราเฟนิบมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งมะเร็งได้หลายชนิด (broad-spectrum anticancer potency)¹¹ อย่างไรก็ตามค่าใช้จ่ายในการรักษาด้วยซอราเฟนิบนั้นมีราคาสูง ทำให้ผู้ป่วยทั่วไปไม่สามารถเข้าถึงการรักษานี้ได้ และถึงแม้ว่าผู้ป่วยได้รับการรักษาด้วยซอราเฟนิบก็พบว่ามียอัตรการรอดชีวิตที่ต่ำ โดย Cheng และคณะ¹⁸ รายงานว่าผู้ป่วยคนเอเชียที่ได้รับยาซอราเฟนิบสามารถยืดอายุชีวิตผู้ป่วยได้ยาวเพิ่มขึ้นเพียง 2.3 เดือน โดยผู้ป่วยที่ได้รับยามีอายุอยู่เฉลี่ย 6.5 เดือนและผู้ป่วยที่ไม่ได้รับยามีอายุเฉลี่ย 4.2 เดือน¹⁸

คุณสมบัติเภสัชพลศาสตร์ (Pharmacodynamic Properties)

ซอราเฟนิบเป็นยาทานที่ใช้ในการยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดในกลุ่มไคเนส (multikinase inhibitor) คือ vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1, VEGFR-2, VEGFR-3, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- β , KIT, FLT-3, RET, RET/PTC] and downstream intracellular serine/threonine kinases in the MAPK cascade [e.g. wild-type BRAF, mutant BRAF and CRAF (Raf-1)] โดยไคเนสเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ (signaling) การแบ่งตัว (proliferation) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) และการอะพอพอโทซิส (apoptosis) ในเซลล์มะเร็ง⁵

สาร Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) ทุกตัวไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ HCC ได้ทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าซอราเฟนิบมีผลต่อเส้นทางการส่งสัญญาณของเซลล์มะเร็งหลายเส้นทาง นอกเหนือจากเส้นทาง MAPK ซึ่งเส้นทางเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องในการเริ่มต้นและการเจริญของ HCC เช่น PI3K/Akt/ mTOR, JAK/STAT, Wnt/ β -catenin, cMET และ IGF pathway⁵

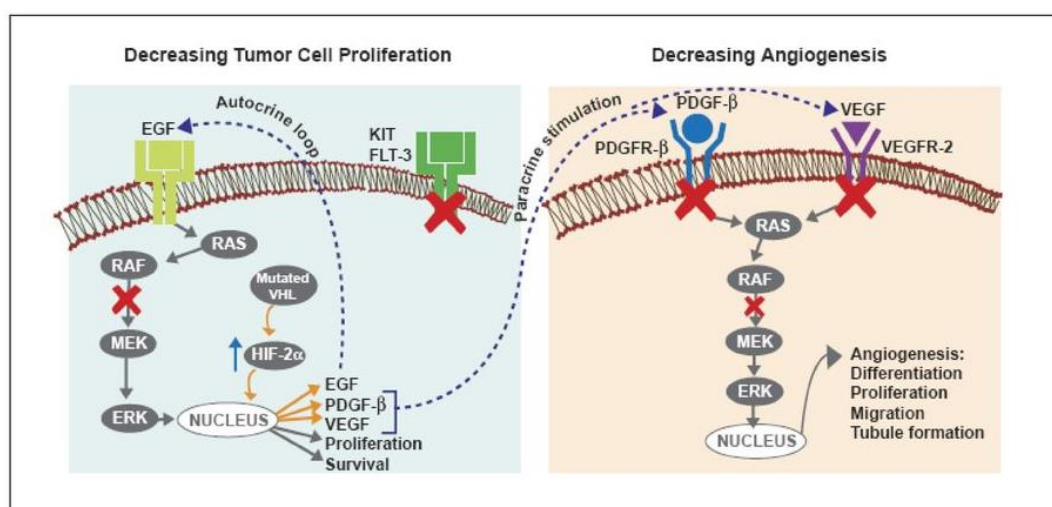
Sorafenib เหนี่ยวนำให้เซลล์มะเร็งตับตายผ่านกลไก MAPK-independent หลายแบบซึ่งเกี่ยวข้องกับการลดลงของ anti-apoptotic Bcl-2 proteins เช่น Mcl-1 และเพิ่มการแสดงออกของ p53-upregulated modulator-of-apoptosis (PUMA) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าซอราเฟนิบ

อาจมีผลกระทบทางภูมิคุ้มกัน เช่น การเสริมฤทธิ์ของเนื้องอก T-effector ที่จำเพาะต่อเซลล์เนื้องอก และลดการปราบปรามเซลล์ภูมิคุ้มกัน⁵

คุณสมบัติเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetic Properties)

ซอราเฟนิบมีชีวประสิทธิผล (bioavailability) 38–49% สามารถจับกับโปรตีนได้ 99.5% (*in vitro*) สามารถกำจัดทางอุจจาระ 77% ปัสสาวะ 19% และมีครึ่งชีวิตประมาณ 25–48 ชั่วโมง⁵

ผลข้างเคียงของยาซอราเฟนิบ เช่น อาการท้องร่วง โรคผิวหนัง ผื่นแพ้ เบื่ออาหาร น้ำหนักลด หมดแรง ปวดท้องและเสียงเปลี่ยน⁵



รูปภาพที่ 4 กลไกการออกฤทธิ์ของซอราเฟนิบ¹⁹

ซอราเฟนิบมีฤทธิ์ยับยั้ง MAPK pathway และ receptor tyrosine kinases ของเซลล์มะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งลดการแบ่งตัวและลดการสร้างหลอดเลือดใหม่ ดังรูปภาพที่ 4¹⁹

ยาเรโกราเฟนิบ (Regorafenib) หรือฟลูออโรซอราเฟนิบ (Fluoro-Sorafenib) ถูกพัฒนาโดยบริษัท Bayer ในประเทศเยอรมันในปี 2554 ซึ่งโครงสร้างมีความแตกต่างจากซอราเฟนิบที่วางพินออกซีเท่านั้น และเป็นยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์ อีกทั้งเป็นยาทานที่สามารถยับยั้งโปรตีนไคเนสได้หลากหลาย (oral drug multikinase) คล้ายกับยาซอราเฟนิบ ซึ่งจะยับยั้งเกี่ยวกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การเจริญเติบโต การแพร่กระจายของมะเร็ง (metastasis) เหมือนกับยาซอราเฟนิบ และจากการศึกษา preclinical พบว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological Activity) ที่ดีกว่ายาซอราเฟนิบ โดยมีประสิทธิภาพต่อต้าน VEGF receptor, C-KIT และ TIE2 มากกว่ายาซอราเฟนิบ (เกี่ยวกับการต่อต้านการสร้างหลอดเลือดใหม่ของมะเร็ง) ดังแสดงในรูปภาพที่ 5 ยาเรโกราเฟนิบได้รับการรับรองจาก US FDA ในปี 2555 ในการรักษามะเร็งลำไส้ใหญ่ในระยะลุกลาม เพราะใช้ได้ผลดีกว่ายาหลอกในการรักษามะเร็งของลำไส้ใหญ่ระยะแพร่กระจาย และในปี 2560 ทาง FDA ได้รับรองยาเรโกราเฟนิบว่าสามารถใช้ในการรักษามะเร็งตับที่ไม่ตอบสนองต่อยาซอราเฟนิบ ผลข้างเคียงของยานี้คือ อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ท้องร่วง แผลในปาก น้ำหนักลด และความดันโลหิตสูง เป็นต้น^{20, 21}

Molecular target	Regorafenib IC ₅₀ (nM) ± SD	Sorafenib IC ₅₀ (nM) ± SD
c-RAF	2.5±0.6	6±3
BRAF	28±10	22±6
BRAF ^{V600E}	19±6	38±9
VEGFR-1	13±0.4	NA
VEGFR-2	4.2±1.6 ^a	90±15
VEGFR-3	46±10 ^a	20±6
TIE-2	311±46	NA
PDGFR-β	22±3	57±20
FGFR-1	202±18	580±100
C-Kit	7±2	68±21
RET	1.5±0.7	NA
Flt-3	NA	58±20

Notes: ^aMurine VEGF-R. Strumberg D, Schultheis B. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(6):879–889, copyright © 2012, Informa Healthcare. Reproduced with permission of Informa Healthcare.³⁰

รูปภาพที่ 5 ค่า IC₅₀ ของยาซอราเฟนิบและยาเรโกราเฟนิบในการยับยั้งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของมะเร็ง²¹

Lenvatinib (Lenvima[®], ถูกพัฒนาโดย Eisai Co. ของประเทศญี่ปุ่น) เป็นยาทานที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis inhibitor) โดยผ่านทาง VEGF receptors (VEGFR1–3), FGF receptors (FGFR1–4), PDGF, receptor α (PDGFR α), KIT และ RET และได้รับการอนุมัติจาก FDA ในปี 2557 ให้ใช้ในการรักษามะเร็งไทรอยด์ที่ไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยสารแร่กัมมันตรังสีไอโอดีน (radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer) และในปี 2560 FDA รับรองให้ใช้ Lenvatinib เพื่อใช้เป็นยาตัวเลือกแรก (frontline) ในการรักษามะเร็งตับระยะลุกลามเหมือนกับยาซอราเฟนิบ โดยผลการศึกษาทางคลินิกระยะที่ 3 (phase 3 trial) ของยา Lenvatinib ในผู้ป่วยมะเร็งตับระยะลุกลาม โดยให้ยา Lenvatinib ขนาด 12 หรือ 8 มิลลิกรัม ขึ้นอยู่กับน้ำหนักต่อน้ำหนักตัว (1 ครั้งต่อวัน) เปรียบเทียบกับทานยา Sorafenib 400 มิลลิกรัม (วันละสองครั้ง) ซึ่งเป็นยามาตรฐาน ผลการศึกษาพบว่า ผู้ป่วยมะเร็งตับตอบสนองต่อยา Lenvatinib ไม่ด้อยไปกว่า (noninferior) ยา Sorafenib โดยพบว่าการยืดอายุโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยกลุ่มที่ได้รับยา Lenvatinib และ Sorafenib ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ^{3, 22}

Kinase	Gene Type	K _i (nM)		IC ₅₀ ^a (nM)	
		Lenvatinib	Lenvatinib	Lenvatinib	Sorafenib
VEGFR1 (FLT1)	Wild type	1.3	4.7-22	21	
VEGFR2 (KDR)	Wild type	0.74	3.0-4.0	20.6	
VEGFR3 (FLT4)	Wild type	0.71	2.3	15.7	
FGFR1	Wild type	22	46-60.8	335-340	
FGFR2	Wild type	8.2	26.6	146-150	
FGFR3	Wild type	15	51.6	339	
FGFR3	K650E	28	110-113	100-104	
FGFR3	K650M	62	251	110	
FGFR4	Wild type	NA	43	3400	
KIT	Wild type	11	85.4	140-144	
KIT	V560G	NA	0.7	4.6	
KIT	T670I	NA	410	60	
KIT	V654A	NA	520	920	
RET	Wild type	1.5	6.4	14.6	
RET	M918T	NA	12	33	
PDGFR α	Wild type	NA	29	1.6	
PDGFR α	V561D	NA	25	5.4	
PDGFR α	T674I	NA	630	86	
PDGFR β	Wild type	NA	39-160	27	
LCK	Wild type	NA	130	960	
FRK	Wild type	NA	160	370	
HER4	Wild type	NA	170	>10000	
BRK	Wild type	NA	180	8300	
HGK	Wild type	NA	400	3300	
ABL	Wild type	NA	660	1050	
EPHB2	Wild type	NA	660	710	
FGR	Wild type	NA	910	1200	
EGFR	Wild type	NA	620-6500	>10000	
c-Met	Wild type	NA	100-520	>10000	

The Applicant examined the kinases activity and the enzyme selectivity profile of lenvatinib using an in vitro homogenous proximity tyrosine kinase assay with HTRF, ELISA and MSA. ^a IC₅₀: Half-maximal inhibitory concentration. NA: Not available.

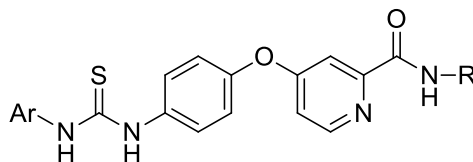
รูปภาพที่ 6 ค่า IC₅₀ ของยาซอราเฟนิบและยาเลนาวาทีนิบในการยับยั้ง Receptor tyrosine kinases (RTKs)²³

วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ในกลุ่มงานวิจัยของคุณ Yao ได้ตีพิมพ์วารสารเกี่ยวกับการพัฒนายาซอราเฟนิบ ทั้งวารสารนานาชาติและภายในประเทศจีนโดยเริ่มตีพิมพ์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2555 จนถึงปัจจุบัน (2562) ได้ตีพิมพ์ทั้งหมด 9 ฉบับดังนี้

ในปี 2555 Yao และคณะ²⁴ ได้ออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ซึ่งมีการแทนที่หมู่ยูเรีย (urea) ด้วยไธโอยูเรีย (thiourea) และทำการปรับเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ (phenyl halide) และปลายเอไมด์ (terminal amide) ได้จำนวน 20 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 7 และได้นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งมะเร็งลำไส้ (HCT116) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) ผลการทดสอบบ่งชี้ว่าการแทนที่บนหมู่เอไมด์ด้วยหมู่ที่ยาว (เช่น หมู่ n-butyl และ benzyl) จะทำให้ฤทธิ์ลดลง ขนาดและรูปร่างของหมู่ R อาจจะมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่แตกต่างกัน หมู่ methyl แสดงการยับยั้งเซลล์ทั้ง MDA-MB-231 และ HCT-116 (IC₅₀ = 16.1–30.6 μ M) หมู่ cyclohexyl แสดงการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ดีต่อ HCT116 (IC₅₀ = 9.15–

26.15 μM) และการแทนที่บนวงวงฟีนีลเฮไลด์ ส่งผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งที่ต่างกันเหมือนกับการแทนที่บนปลายเอไมด์ ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 1²⁴



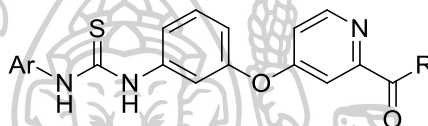
รูปภาพที่ 7 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2555²⁴

ตารางที่ 1 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231)²⁴

Ar	R	IC_{50} (μM)	
		HCT116	MDA-MB-231
		30.6 ± 0.9	33.4 ± 1.5
		25.3 ± 1.0	29.7 ± 0.7
		16.1 ± 2.5	80.1 ± 4.2
		9.15 ± 0.7	>200
Sorafenib		7.8 ± 0.8	36 ± 2.1

ในปี 2555 Yao และคณะ⁹ ได้ออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ซึ่งมีการแทนที่หมู่ยูเรีย (urea) ด้วยไธโอยูเรีย (thiourea) เปลี่ยนการแทนที่บนวงฟีนอกซีจาก 1,4 เป็น 1,3-disubstitution และปรับเปลี่ยนที่วงฟีนีลเฮไลด์และปลายเอไมด์ โดยในงานวิจัยนี้สังเคราะห์

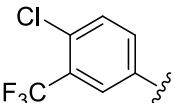
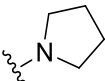
โมเลกุลเลียนแบบใหม่ทั้งหมด 23 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 8 และนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) พบว่า HCT116, MDA-MB-231 และ PC-3 มีค่า $IC_{50} = 2.8\text{--}52.0\ \mu\text{M}$, $21.2\text{--}75.0\ \mu\text{M}$ และ $2.2\text{--}45.6\ \mu\text{M}$ ตามลำดับ โดยสารที่มีการแทนที่ R_1 ด้วย benzylamino หรือ cyclohexylamino group มีฤทธิ์ในการยับยั้งที่ดีกว่าซอราเฟนิบ ($7.8 \pm 1.1\ \mu\text{M}$, $6.8 \pm 0.9\ \mu\text{M}$) 2.8 และ 3 เท่า สำหรับ PC-3 ($2.8 \pm 0.4\ \mu\text{M}$) และ HCT-116 ($2.2 \pm 0.4\ \mu\text{M}$) ตามลำดับและผลการทดสอบ MDA-MB-231 มีค่า $IC_{50} = 21.2\text{--}40.2\ \mu\text{M}$ ซึ่งใกล้เคียงกับสารในงานวิจัยก่อนหน้า ($29.7\text{--}122.5\ \mu\text{M}$) การแทนที่บนวงฟีนอกซีจาก 1,4 เป็น 1,3-disubstitution ทำให้เพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity) สำหรับ PC-3 และ HCT-116 ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจ แสดงในตารางที่ 2⁹



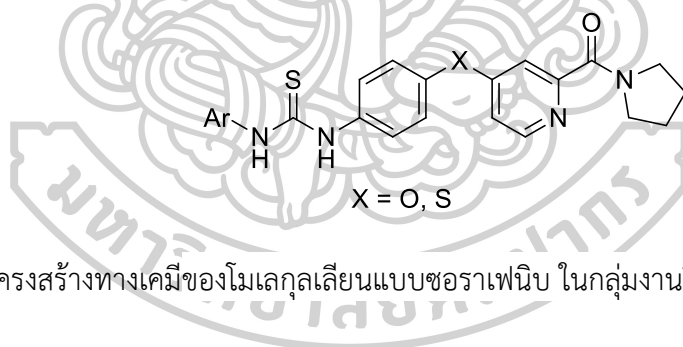
รูปภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2555⁹

ตารางที่ 2 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3)⁹

Ar	R	IC_{50} (μM)		
		HCT116	MDA-MB-231	PC-3
		15.1 ± 1.3	35.7 ± 1.2	16.1 ± 1.1
		6.9 ± 1.9	22.1 ± 1.8	8.5 ± 1.4
		9.3 ± 1.0	21.2 ± 1.0	6.8 ± 1.5
		2.8 ± 0.4	34.2 ± 1.5	2.2 ± 0.4

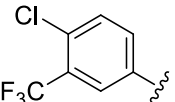
		22.4 ± 1.0	40.2 ± 1.1	12.1 ± 1.9
Sorafenib		7.8 ± 1.1	36.6 ± 2.1	6.8 ± 0.9

และในปี 2555 Yao และคณะ⁷ พบว่าในงานวิจัยก่อนหน้าของกลุ่มของเขาพบว่า ไธโอยูเรียเพิ่มความจำเพาะต่อเซลล์และเมื่อใส่วงแหวน pyrrolidine จะทำให้เพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และเซลล์ต่อมลูกหมาก (PC-3) มากขึ้น จึงได้ออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบทั้งหมด 2 ซีรีส์คืออีเทอร์ (ether) และไธโออีเทอร์ (thioether) ซึ่งมีการแทนที่หมู่ยูเรีย (urea) ด้วยไธโอยูเรีย (thiourea) แทนที่ methyl amide ด้วยวงแหวน pyrrolidine และได้ทำการปรับเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ โดยในงานวิจัยนี้สังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบใหม่ทั้งหมด 23 โมเลกุลที่ต่างกัันดังรูปภาพที่ 9 และนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) มะเร็งลำไส้ (HCT116) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) พบว่า PC-3 IC₅₀ = 5.2-99.0 μmol/L HCT116 IC₅₀ = 5.9-128.1 μmol/L MDA-MB-231 ส่วนใหญ่ไม่มีฤทธิ์ยกเว้นโมเลกุลที่มีวงฟีนิลเฮไลด์เป็น 3-CF₃, 4-Cl-disubstituted และ 3,5-CF₃-disubstituted และซีรีส์คือไธโออีเทอร์มีฤทธิ์ที่ดีกว่าซีรีส์อีเทอร์ประมาณ 3 เท่าและ 4 เท่าสำหรับเซลล์ PC-3 และ HCT116 ตามลำดับ ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC₅₀ ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 3⁷



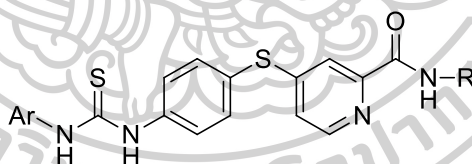
รูปภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2555⁷

ตารางที่ 3 แสดงโครงสร้างและค่า IC₅₀ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116), เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3)⁷

		IC ₅₀ (μM)		
Ar	X	PC-3	HCT116	MDA-MB-231
	O	22.0 ± 1.8	11.2 ± 0.9	50.1 ± 2.2

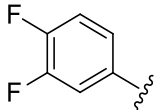
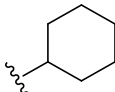
	O	16.8 ± 1.9	21.2 ± 1.0	38.8 ± 1.5
	S	7.3 ± 0.4	5.9 ± 0.6	80.8 ± 3.0
	S	5.2 ± 0.8	8.3 ± 1.0	20.2 ± 1.8
Sorafenib		6.8 ± 1.1	7.8 ± 1.1	36.6 ± 2.1

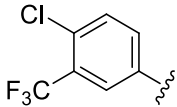
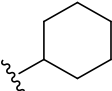
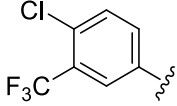

ปี 2556 Yao และคณะ²⁵ ได้ออกแบบและสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ซึ่งมีการแทนที่หมู่ยูเรีย ด้วยไฮโดรยูเรีย อีเทอร์เป็นไฮโออีเทอร์ และปรับเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์และปลายเอไมด์ โดยในงานวิจัยนี้สังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบใหม่ทั้งหมด 21 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 10 และนำไปทดสอบกับเซลล์ HCT-116 และ MDA-MB-231 พบว่ามีหลายโมเลกุลที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับยาซอราเฟนิบ และเมื่อเปลี่ยนจากหมู่เมทิล (methyl) ที่เอไมด์เป็นไซโคลเฮกซิล (cyclohexyl) ค่า IC₅₀ จะต่ำกว่ายามาตรฐาน (ฤทธิ์ดีกว่ายาซอราเฟนิบ) สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) อีกทั้งโมเลกุลในซีรีส์นี้ มีความจำเพาะที่ดีต่อเซลล์ HCT-116 มากกว่าเซลล์ MDA-MB-231 HCT116 IC₅₀ = 1.8–78.0 μM ซึ่งแสดงโครงสร้างและค่า IC₅₀ ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 4²⁵



รูปภาพที่ 10 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2556²⁵

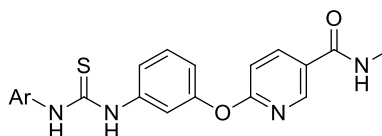
ตารางที่ 4 แสดงโครงสร้างและค่า IC₅₀ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) ²⁵

		IC ₅₀ (μM)	
Ar	R	HCT116	MDA-MB-231
		3.3 ± 0.14	>200

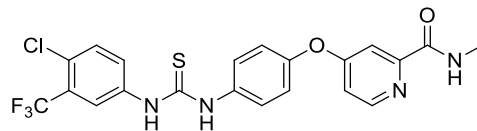
		1.8 ± 0.7	>200
		12.0 ± 2	84.0 ± 4.2
Sorafenib		7.8 ± 1.1	36.6 ± 2.1

ปี 2558 Yao และคณะ¹² ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบและทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยพบว่าในงานวิจัยก่อนหน้า 1) ไธโอยูเรีย (thiourea) เพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 2) หมู่เมทิล (methyl) ที่เอไมด์จะทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งดีที่สุด 3) การแทนที่แบบ 1,3 (1,3-disubstitution) จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งดีกว่า 1,4-disubstitution และในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้สังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบที่มีการแทนที่หมู่ยูเรีย ด้วยไธโอยูเรีย อีเทอร์เป็นไออีเทอร์ เปลี่ยนการแทนที่ของวงพีนีลจาก 1,4 เป็น 1,3-disubstitution และเปลี่ยนจากวงไพริดีนเป็น 2,5-นิโคตินาไมด์ (2,5-nicotinamide) โดยมีเหตุผลว่า 1) อาจจะมีการเปลี่ยนการจับที่ active site 2) 2,5-disubstitution สามารถเพิ่มการละลายน้ำเพราะไม่มีการสร้างพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของหมู่นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) 3) การแทนที่แบบ 2,5-disubstitution เพิ่มความคล้ายคลึงกับยามาตรฐานที่ได้รับรองจาก FDA และปรับเปลี่ยนที่วงพีนีลเฮไลด์¹²

จากนั้นนำโมเลกุลใหม่ที่สังเคราะห์ได้ทั้งหมด 14 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 11 ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) และมะเร็งตับ (HepG2) พบว่าโมเลกุลส่วนมากของงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ที่ดีสำหรับเซลล์มะเร็งทั้ง 4 ชนิด มีค่า $IC_{50} = 2.21-53.75 \mu\text{M}$, $2.33-69.34 \mu\text{M}$, $1.98-67.38 \mu\text{M}$, $4.55-85.34 \mu\text{M}$ ที่ดีกว่าซอราเฟนิบ ($8.41 \pm 0.19 \mu\text{M}$, $17.84 \pm 1.93 \mu\text{M}$, $10.98 \pm 0.67 \mu\text{M}$, $10.48 \pm 1.52 \mu\text{M}$) สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมากและมะเร็งตับ และจากผลการทดสอบฤทธิ์พบว่าเมื่อมีหมู่ดึงอิเล็กตรอน (electron-withdrawing group) ที่แรง 2 หมู่บนวงพีนีล จะมีฤทธิ์ที่ดีกว่ามีหมู่ดึงอิเล็กตรอนเพียงหมู่เดียวและเมื่อมีการแทนที่บนวงไพริดีน (pyridine) แบบ 2,5-disubstitution (nicotinamide) จะฤทธิ์ดีกว่า 2,4-disubstitution และหมู่นิโคตินาไมด์ (5.35) ทำให้เกิดการจับกับ MDA-MB-231 แบบใหม่ที่ดีกว่าหมู่ไพริดีน (24.89) ถึง 5 เท่าของงานวิจัยก่อนหน้า (BMCL90, แสดงโครงสร้างสารดังรูปภาพที่ 12)¹² ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 5¹²



รูปภาพที่ 11 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2558¹²



BMCL9o

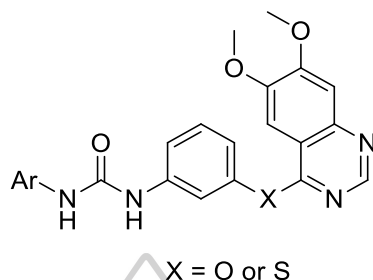
รูปภาพที่ 12 โครงสร้างทางเคมีของสาร BMCL9o²⁴

ตารางที่ 5 แสดงโครงสร้างและค่า IC₅₀ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116), เซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231), เซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) และมะเร็งตับ (HepG2)¹²

Ar	IC ₅₀ (μM)			
	HCT116	MDA-MB-231	PC-3	HepG2
	3.12 ± 0.55	3.02 ± 0.42	2.67 ± 0.02	8.53 ± 0.56
	2.50 ± 0.35	2.67 ± 0.15	5.86 ± 0.25	4.55 ± 0.34
	2.21 ± 0.09	2.33 ± 0.22	1.98 ± 0.23	5.35 ± 0.21
BMCL9o	14.58 ± 0.34	42.43 ± 0.68	16.38 ± 0.38	24.89 ± 1.45
Sorafenib	8.41 ± 0.19	17.84 ± 1.93	10.98 ± 0.67	10.48 ± 1.52

ในปี 2560 Yao และคณะ²⁶ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทั้งหมด 2 ซีรีส์คืออีเทอร์ (ether) และไธโออีเทอร์ (thioether) แทนที่หมู่ picolinamide (pyridine) เป็นหมู่ quinazoline เปลี่ยนการแทนที่ของวงพีนีลจาก 1,4 เป็น 1,3-disubstitution และได้ปรับเปลี่ยนที่วงพีนีลเฮไลด์ จากนั้นนำโมเลกุลใหม่ทั้ง 17 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 13 ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ HCT116 และ HCT115 พบว่าโมเลกุลส่วนใหญ่มีฤทธิ์ (IC₅₀=8.21-87.77 μM, 6.96-87.36 μM สำหรับ HCT116 และ HCT115 ตามลำดับ) ที่แยกว่ายาซอราเฟนิบ (IC₅₀=12.81 μM, 14.12 μM สำหรับ HCT116 และ HCT115 ตามลำดับ) และซีรีส์ที่เป็น thioether จะมีฤทธิ์ที่ดีกว่าซีรีส์ ether จากนั้นนำสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุด (GD-09) ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งชนิดอื่นอีก 15 ชนิดคือ SW-480, HT-29, LNCap, PC3, DU145, BGC-823, MNK-45, AGS, MCF-7, MDA-MB-231, SiHa, Hela, H460, LLC และ B16 พบว่ามีฤทธิ์

ที่ดีกว่า ($8.43 \pm 0.32 \mu\text{M}$, $14.88 \pm 1.31 \mu\text{M}$) ยาซอราเฟนิบ ($14.30 \pm 1.82 \mu\text{M}$, $23.98 \pm 1.91 \mu\text{M}$) สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านม (MDA-MB-231) และปอด (H460) และพบว่าซิริสไฮโออีเทอร์มีฤทธิ์ที่ดีกว่าซิริสไฮโออีเทอร์เหมือนกับในงานวิจัยก่อนหน้า ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 6²⁶



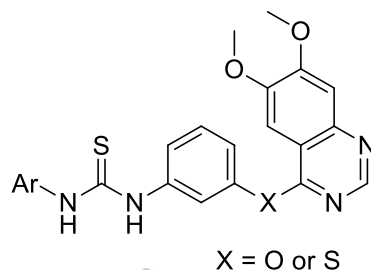
รูปภาพที่ 13 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2560²⁶

ตารางที่ 6 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116 และ HCT15)²⁶

Ar	X	IC_{50} (μM)	
		HCT-15	HCT-116
	O	49.60 ± 4.96	33.63 ± 1.45
	S	8.21 ± 0.50	6.96 ± 0.73
Sorafenib		12.81 ± 1.06	14.12 ± 0.85

ในปี 2561 Yao และคณะ¹⁴ ได้ทำการสังเคราะห์คล้ายกับซิริสในปี 2560 (ทั้งหมด 2 ซิริสคืออีเทอร์ (ether) และไฮโออีเทอร์ (thioether) แทนที่หมู่ picolinamide (pyridine) เป็นหมู่ quinazoline เปลี่ยนการแทนที่ของวงพีนีลจาก 1,4 เป็น 1,3-disubstitution และได้ปรับเปลี่ยนที่วงพีนีลเฮไลด์) โดยในงานวิจัยนี้แตกต่างตรงที่เป็นไฮโอยูเรีย (thiourea) แทนยูเรีย (urea) และได้นำสารใหม่ทั้งหมด 14 โมเลกุลที่ต่างกัันดังรูปภาพที่ 14 ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งผิวหนัง (B16) และเอนไซม์ (EGFR และ VEGFR-2 ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวน การเปลี่ยนสภาพของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์และการสร้างหลอดเลือดใหม่) พบว่าเมื่อมีหมู่ดึงอิเล็กตรอน (electron-withdrawing group) ที่แรง 2 หมู่บนวงพีนีล (เช่น -F, -Cl, -Br, -CF₃) จะมีฤทธิ์ที่ดีกว่าการที่มีหมู่ให้อิเล็กตรอนและซิริสไฮโออีเทอร์เพิ่มความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสอง โดยค่า IC_{50} ในงานวิจัย

นี้ (8.35-9.57 μM , 14.79-32.43 μM , 5.57-42.16 μM) มีค่าใกล้เคียงกับซอราเฟนิบ (10.55 μM , 17.87 μM , 9.29 μM) สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งผิวหนัง (B16) ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 7¹⁴



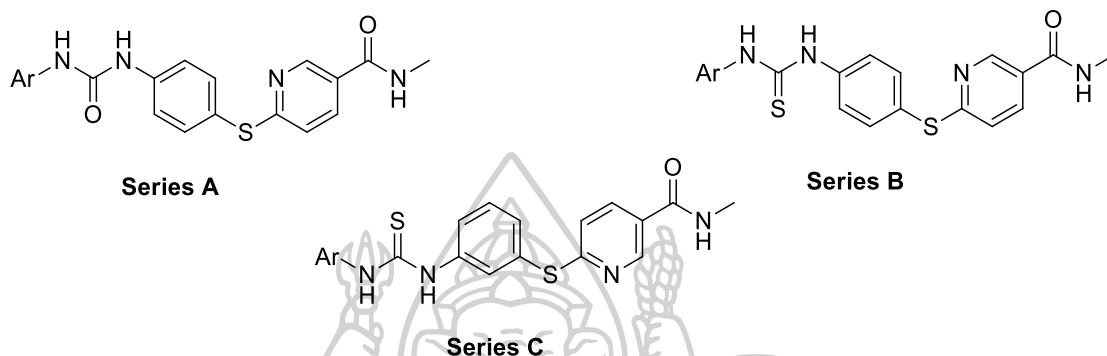
รูปภาพที่ 14 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ในปี 2561¹⁴

ตารางที่ 7 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116), มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งผิวหนัง (B16)¹⁴

		IC_{50} (μM)				
Ar	X	EGFR	VEGFR-2	HCT116	MCF-7	B16
	O	0.02	0.05	9.13	17.72	6.11
	S	0.01	0.07	8.11	20.91	7.89
	S	0.01	0.08	8.35	15.66	5.57
Sorafenib		0.02	0.08	10.55	17.87	9.29

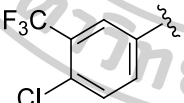
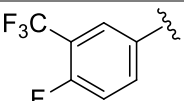
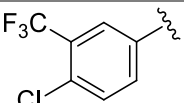
ในปี 2561 Yao และคณะ⁹ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบ โดยสังเคราะห์ทั้งหมด 3 ซีรีส์คือ 1. เปลี่ยน อีเทอร์เป็นไฮโออีเทอร์ 2. เปลี่ยนจากอีเทอร์ (ether) เป็นไฮโอยูเรีย (thiourea) และอีเทอร์เป็นไฮโออีเทอร์ 3. เปลี่ยนจากอีเทอร์ (ether) เป็นไฮโอยูเรีย (thiourea) และ 1,4-อีเทอร์เป็น 1,3-ไฮโออีเทอร์ โดยทั้ง 3 ซีรีส์ ทำการแทนที่ที่วงไพริดีนเป็น 2,5-นิโคตินาไมด์ (2,5-nicotinamide) แปรเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ และได้สารใหม่ทั้งหมด 20 โมเลกุล ที่แตกต่างกันดัง **รูปภาพที่ 15** ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และมะเร็งผิวหนัง (B16BL6) พบว่าซีรีส์ที่ 1 มีค่า IC_{50} = 5.29-7.09 μM , 24.59-45.18 μM ซีรีส์ที่ 2 มีค่า IC_{50} = 4.90-

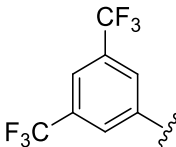
52.44 μM , 24.59-69.29 μM ซีรีส์ที่ 3 มีค่า $\text{IC}_{50} = 5.02\text{-}39.49 \mu\text{M}$, 19.22-67.46 μM ดีกว่า ซอราเฟนิบ $\text{IC}_{50} = 8.41 \mu\text{M}$, 36.48 μM สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และมะเร็งผิวหนัง (B16BL6) ตามลำดับ โดยหมู่ไธโออีเทอร์ (thioether) และ 2,5-นิโคตินาไมด์ (2,5-nicotinamide) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็ง และการที่มีหมู่ตั้งอิเล็กตรอนแรงๆ ตำแหน่งที่ 3,4 บนวงฟีนิลเฮไลด์ ทำให้เพิ่มการยับยั้งเอนไซม์และฤทธิ์ต้านการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 8⁹



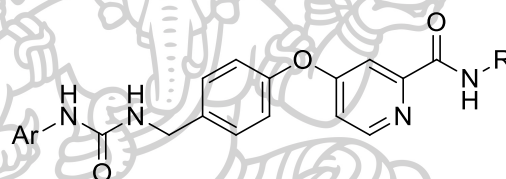
รูปภาพที่ 15 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Yao และคณะ ทั้งหมด 3 ซีรีส์ (A, B และ C) ในปี 2561⁹

ตารางที่ 8 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT116) และมะเร็งผิวหนัง (B16BL6)⁹

Ar	IC_{50} (μM)	
	HCT116	B16BL6
 <p>Series A</p>	5.29 ± 0.55	24.59 ± 0.60
 <p>Series B</p>	6.37 ± 0.48	29.32 ± 1.31
 <p>Series C</p>	5.18 ± 0.53	19.75 ± 0.63

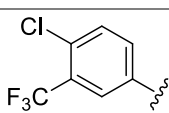
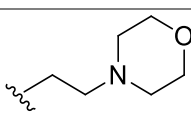
 <p style="text-align: center;">Series C</p>	5.02 ± 0.27	54.16 ± 2.69
Sorafenib	8.41 ± 0.19	36.48 ± 3.52

ในปี 2556 Chen และคณะ¹¹ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ยาซอราเฟนิบโดยเปลี่ยนจากยูเรีย (urea) เป็นเบนซิลยูเรีย (benzyl urea) และแปรเปลี่ยนที่เมทิลเอไมด์และฟีนิลเฮไลด์ได้สารใหม่ทั้งหมด 22 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 16 นำไปทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็ง 4 ชนิด คือ มะเร็งเต้านม (MX-1) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งไต (Ketr3) และมะเร็งลำไส้ (HT-29) พบว่า *p*-Cl, *m*-CF₃ ที่วงฟีนิลมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ HepG2 (IC₅₀ = 5.69 μM) ที่ดีกว่าซอราเฟนิบ (IC₅₀ = 8.05 μM) ประมาณ 1.4 เท่า หมู่ให้อิเล็กตรอน เช่นหมู่ *p*-CH₃ และ *p*-OCH₃ ทำให้ค่า IC₅₀ อยู่ในช่วง 31.6 μM ถึง 50 μM ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC₅₀ ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 9¹¹



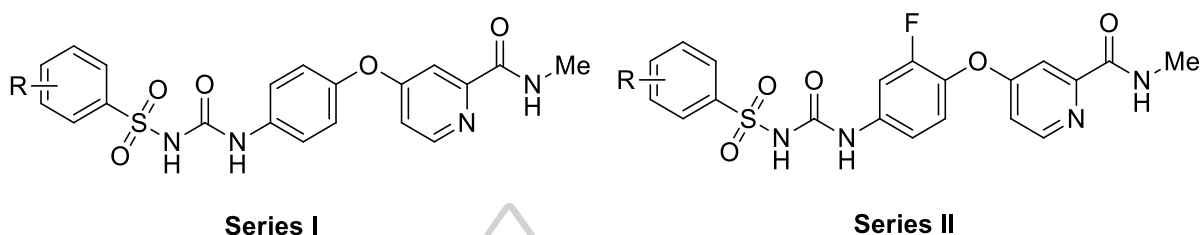
รูปภาพที่ 16 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Chen และคณะในปี 2556¹¹

ตารางที่ 9 แสดงโครงสร้างและค่า IC₅₀ ในการยับยั้งมะเร็งเต้านม (MX-1) มะเร็งตับ (HepG2) และมะเร็งไต (Ketr3)¹¹

Ar	R	IC ₅₀ (μM)			
		MX-1	HepG2	Ketr3	HT-29
		13.6	5.69	7.31	13.6
Sorafenib		8.43	8.05	10.4	11.3

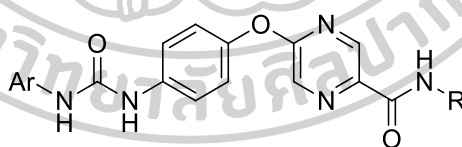
ในปี 2558 Wufu และคณะ²⁷ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ยาซอราเฟนิบที่มีหมู่ซัลโฟนิลยูเรีย (Sulfonylurea) 2 ซีรีส์ใหม่จำนวน 11 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 17 และนำไปทำทดสอบกับเซลล์มะเร็งปอด (A549) ปากมดลูก (Hela) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งต่อม

ลูกหมาก (PC-3) พบว่าทั้ง Series I มีค่า $IC_{50} = 27-86 \mu M$, $>60 \mu M$, $16.54-80.56 \mu M$, $17.97-68.87 \mu M$ Series II มีค่า $IC_{50} = 32.59-57.42 \mu M$, $24.65-44.32 \mu M$, $17.19-69.25 \mu M$, ไม่ได้คำนวณค่า ซึ่งทั้ง 2 ซีรีส์มีฤทธิ์ที่แยกว่ายามาตรฐาน สำหรับ A549 ($IC_{50} = 6.53 \pm 0.82 \mu M$), HeLa ($IC_{50} = 8.08 \pm 0.91 \mu M$) MCF-7 ($IC_{50} = 4.21 \pm 0.62 \mu M$) และ PC-3 ($IC_{50} = 11.05 \pm 1.0 \mu M$) ตามลำดับ²⁷



รูปภาพที่ 17 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ยาซอราเฟนิบที่มีหมู่ซัลโฟนิลยูเรีย (Sulfonyleurea) ทั้ง 2 ซีรีส์ของ Wufu และคณะ ในปี 2558²⁷

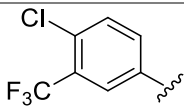
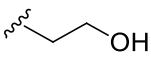
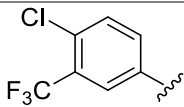
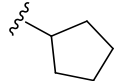
ในปี 2559 Branka และคณะ¹³ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบ ที่มีการแทนที่วงแหวนไพริดีน (pyridine) เป็นวงแหวนไพราซีน (pyrazine) และทำการแปรเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ และเมทิลเอไมด์ จากนั้นนำโมเลกุลใหม่ในงานวิจัยนี้ทั้ง 9 โมเลกุลที่แตกต่างกันดัง**รูปภาพที่ 18** ไปทดสอบการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (CEM) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Molt4/C8) มะเร็งเม็ดตับ (HepG2) มะเร็งปากมดลูก (HeLa) มะเร็งลำไส้ (SW620) มะเร็งเต้านม (MCF-7) มะเร็งปอด (WI-38) และเซลล์มะเร็งปอด (A549) โดยทุกโมเลกุลในงานวิจัยนี้ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งและมีความจำเพาะเจาะจงแต่ละเซลล์มะเร็งที่ติกว่ายาซอราเฟนิบ โดยเฉพาะการทดสอบในเซลล์ HepG2 มีค่า IC_{50} ตีกว่ายาซอราเฟนิบ ($IC_{50}=6.2 \mu M$) ถึง 9 เท่า ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงใน**ตารางที่ 10**¹³



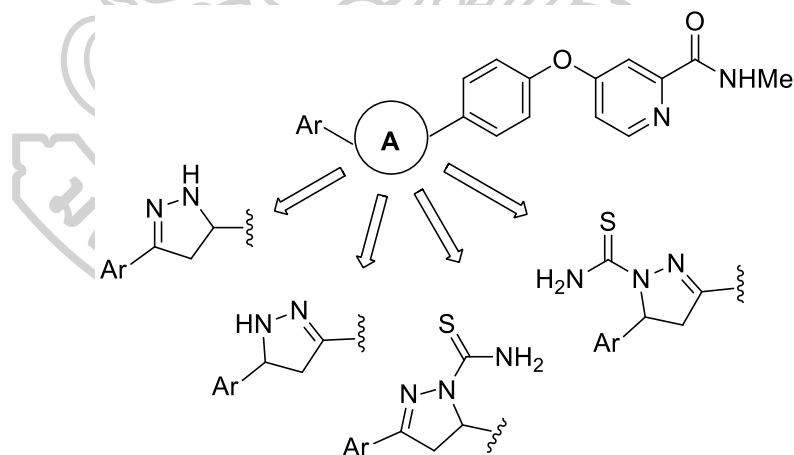
รูปภาพที่ 18 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Branka และคณะในปี 2559¹³

ตารางที่ 10 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งมะเร็งตับ (HepG2)¹³

IC_{50} (μM)		
Ar	R	HepG2
		0.7 ± 0.1

		0.9 ± 0.1
		0.7 ± 0.1
Sorafenib		6.2 ± 1.8

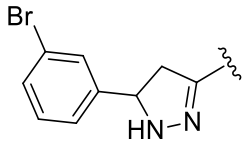
ในปี 2560 Pengwu และคณะ²⁸ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอร์afenิบ 4 ซีรีส์ ทั้งหมด 23 โมเลกุล ที่แตกต่างกันด้วย**รูปภาพที่ 19** โดยแทนที่หมู่ยูเรีย (urea) เป็นวงแหวนไพราโซล (pyrazole) ที่แตกต่างกัน 4 แบบและทำการแปรเปลี่ยนที่วงเบนซิลเฮไลด์และเมทิลเอไมด์ พบว่าโมเลกุลในงานวิจัยนี้ มีฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด (A549) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) ที่ดี พบว่าโมเลกุลดังแสดง**ตารางที่ 11** มีค่า IC₅₀ ต่ำกว่า และมีความจำเพาะเจาะจง (IC₅₀ = 2.84 μM, 1.85 μM, 1.96 μM, 3.54 μM) มากกว่ายาซอร์afenิบ (IC₅₀ = 2.92 μM, 3.44 μM, 3.18 μM, 3.24 μM) สำหรับเซลล์มะเร็งปอด (A549) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3) ตามลำดับ ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC₅₀ ของสารที่น่าสนใจแสดงใน**ตารางที่ 11**²⁸



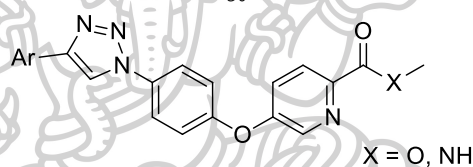
รูปภาพที่ 19 โครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์ยาซอร์afenิบที่มีวงแหวนไพราโซล (pyrazole) ทั้ง 4 ซีรีส์ของ Pengwu และคณะ ในปี 2560²⁸

ตารางที่ 11 แสดงโครงสร้างและค่า IC₅₀ ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด(A549) มะเร็งตับ (HepG2) มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งต่อมลูกหมาก (PC-3)²⁸

IC₅₀ (μM)

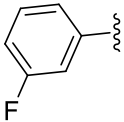
	A549	HepG2	MCF-7	PC-3
	2.84 ± 0.78	1.85 ± 0.03	1.96 ± 0.28	3.54 ± 0.61
Sorafenib	2.92 ± 0.68	3.44 ± 0.50	3.18 ± 0.18	3.24 ± 0.45

ในปี 2560 Mingze และคณะ²⁹ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบใหม่ทั้งหมด 25 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 20 โดยแทนที่หมู่ยูเรีย (urea) ด้วยวงแหวน 1,2,3-ไตรเอโซล (1,2,3-triazole) และทำการแปรเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ จากนั้นนำโมเลกุลในงานวิจัยนี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งลำไส้ (HCT-29) พบว่าโมเลกุลดังแสดงในตารางที่ 12 มีฤทธิ์ ($IC_{50} = 0.20 \pm 0.01 \mu M$, $0.61 \pm 0.12 \mu M$) ที่ดีกว่ายาซอราเฟนิบ ($IC_{50} = 5.29 \pm 0.32 \mu M$, $43.30 \pm 1.36 \mu M$) 26.5 และ 80 เท่า สำหรับเซลล์มะเร็งลำไส้และมะเร็งปากมดลูกตามลำดับ ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 12²⁹



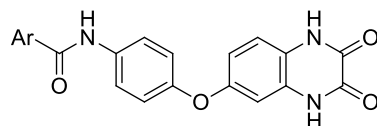
รูปภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Mingze และคณะ ในปี 2560²⁹

ตารางที่ 12 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HCT-29) และมะเร็งเต้านม (MCF-7)²⁹

		IC_{50} (μM)	
Ar	X	HT-29	MCF-7
	NH	0.20 ± 0.01	0.61 ± 0.12
Sorafenib		5.29 ± 0.32	43.30 ± 1.36

ในปี 2561 Farshid และคณะ¹⁵ ได้ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ซอราเฟนิบโดยแทนที่หมู่ยูเรีย (urea) ด้วยเอไมด์ (amide) วงพิโคลินาไมด์ (picolinamide) เป็นวง quinoxalinedione และแปรเปลี่ยนที่วงฟีนิลเฮไลด์ ได้สารใหม่ทั้งหมด 9 โมเลกุลที่แตกต่างกันดังรูปภาพที่ 21 จากนั้นนำ

โมเลกุลที่สังเคราะห์ได้ไปทดสอบฤทธิ์การต้านการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) ที่ดี พบว่าโมเลกุลมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 16.87 - 53.05 μM และ 18.12 - 55.92 μM สำหรับมะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งปากมดลูก (Hela) ซึ่งแสดงโครงสร้างสารและค่า IC_{50} ของสารที่น่าสนใจแสดงในตารางที่ 13¹⁵



รูปภาพที่ 21 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ ในกลุ่มงานวิจัยของ Farshid และคณะ ในปี 2561¹⁵

ตารางที่ 13 แสดงโครงสร้างและค่า IC_{50} ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) และมะเร็งปากมดลูก (Hela)¹⁵

Ar	IC_{50} (μM)	
	MCF-7	Hela
	16.87 ± 1.04	18.12 ± 0.86
	16.94 ± 1.54	18.15 ± 1.80

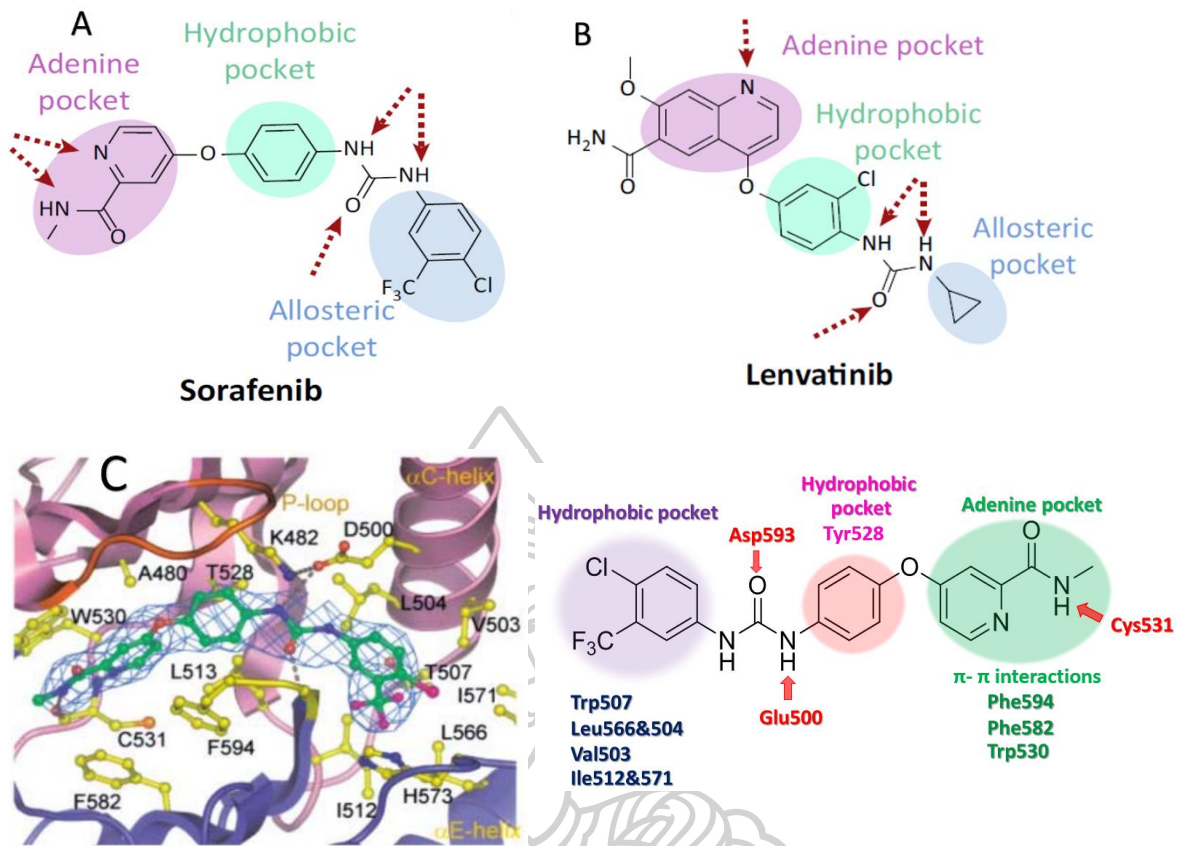


บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

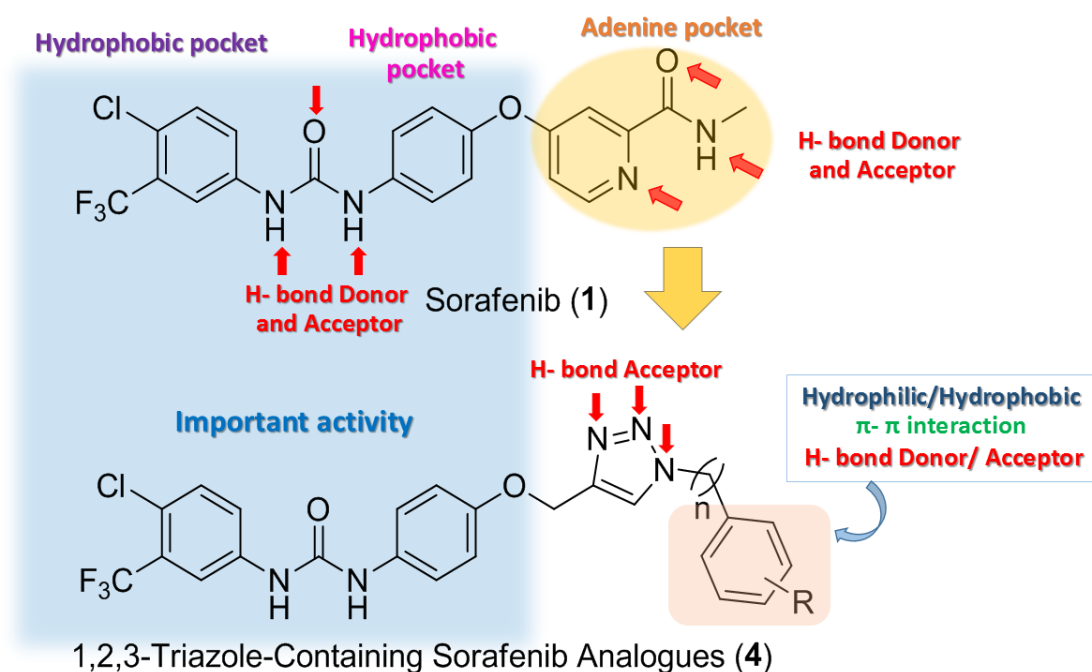
แนวคิดการออกแบบโมเลกุล

เมื่อพิจารณาการจับ (binding mode) ของยา Sorafenib (A) Lenvatinib (B) กับเอนไซม์ VEGFR2 พบว่าวงฟีนิลเฮไลด์ (phenyl halide) กับไซโคลโพรพิล (cyclopropyl) จับกับ allosteric pocket (บริเวณหนึ่งของเอนไซม์บางชนิด เมื่อจับกับโมเลกุลเล็กๆจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเอนไซม์ในบริเวณเร่ง (active site) ทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป) เป็นผลให้หมู่ยูเรีย (urea) และไนโตรเจนบนวงพิโคลินาไมด์ (picolinamide) และควิโนลีน (quinoline) สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ วงฟีนอกซี (phenoxy) เกิดอันตรกิริยา (interaction) กับ hydrophobic pocket และวงพิโคลินาไมด์และควิโนลีนเกิดอันตรกิริยา (interaction) กับ adenine pocket³⁰ นอกจากนี้เมื่อศึกษา X-ray crystallography ระหว่างเอนไซม์ BRAF กับซอราเฟนิบ พบว่าซอราเฟนิบเกิดอันตรกิริยากับบริเวณเร่งเอนไซม์ BRAF ใกล้เคียงกับบริเวณเร่งเอนไซม์ VEGFR2³¹ โดยวงฟีนิลเฮไลด์เกิดอันตรกิริยากับ hydrophobic pocket ที่เกิดจากกรดอะมิโนชนิดลิวซีน (566 และ 504), วาลีน (503) ทริปโตเฟน (507) และไอโซลิวซีน (512 และ 571) หมู่ยูเรียสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกรดอะมิโนชนิดกรดแอสปาทิกกับกรดกลูตามิก วงฟีนอกซีเกิดอันตรกิริยากับ hydrophobic pocket ที่เกิดจากกรดชนิดลิวซีน (513) กับทรีโอนีน (528) NH บนวงพิโคลินาไมด์สร้างพันธะไฮโดรเจนกับ SH ของซิสเทอีน และอะโรมาติกของวงพิโคลินาไมด์เกิดอันตรกิริยาแบบไพ-ไพกับวงอะโรมาติกฟีนอลอานีน (594 และ 582) และทริปโตเฟน (530) ดังรูปภาพที่ 22³¹



รูปภาพที่ 22 การการจับ (binding mode) ของเอนไซม์ VEGFR2 กับโครงสร้างทางเคมีของ Sorafenib (A) Lenvatinib (B)³⁰ และ X-ray crystallography ระหว่างเอนไซม์ BRAF และซอราเฟนิบ (C)³¹

ในงานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลินาไมด์ของซอราเฟนิบ ซึ่งวง 1,2,3-ไตรเอโซลเชื่อมต่อกับวงเบนซีนที่มีหมู่แทนที่ที่แตกต่างกัน (4) นอกจากนี้ในงานวิจัยก่อนหน้าได้รายงานวาวงฟีนิลเฮไลด์ หมู่ยูเรียและวงฟีนอกซีมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง⁷⁻⁹ และวง 1,2,3-ไตรเอโซลเป็นวงอะโรมาติกที่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาแบบไพ-ไพ คล้ายกับหมู่พิโคลินาไมด์ของซอราเฟนิบ นอกจากนี้ยังคล้ายกับ 4 วงเฮทเทอโรไซเคิลในงานวิจัยก่อนหน้าที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งอีกหลายชนิด¹²⁻¹⁵ อีกทั้งวง 1,2,3-ไตรเอโซลยังมีข้อดีหลายประการดังนี้เช่น เพิ่มความมีขั้วของโมเลกุล มีความคล้ายกับกรดอะมิโนฮิสทีดิน มีความเสถียรต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม สามารถเพิ่มพันธะไฮโดรเจนได้และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย¹⁶ ดังรูปภาพที่ 23



รูปภาพที่ 23 แนวคิดการออกแบบและการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีวง 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลีนาไมด์ของซอราเฟนิบ (4)

Experimental section

สารเคมี วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้

สารตั้งต้น รีเอเจนต์ และสารเคมีอื่นๆ ถูกซื้อมาจากบริษัท Sigma-Aldrich, Tokyo Chemical Industry (TCI) และ Acros Organics สำหรับตัวทำละลายที่ใช้ตั้งปฏิกิริยาเป็นตัวทำละลายระดับที่มีความบริสุทธิ์สูง (analytical grade) ซึ่งถูกซื้อมาจากบริษัท Sigma Aldrich และ RCI Labscan, สำหรับตัวทำละลายที่ใช้แยกสารให้บริสุทธิ์ใช้ระดับ commercial grade มาจาก Carlo Erba และ RCI Labscan ได้แก่ เฮกเซน (hexane), ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; DCM), เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate; EtOAc), เมทานอล (methanol), และ *n*-บิวทานอล (*n*-butanol) โดยตัวทำละลายเหล่านี้จะถูกกลั่นแบบง่ายก่อนใช้, น้ำกลั่นที่ใช้เป็นน้ำ RO ที่ผ่านกระบวนการ Reverse Osmosis (RO) สำหรับการวิเคราะห์ติดตามและตรวจสอบสารและปฏิกิริยาใช้ที่แอลซี (Thin Layer Chromatography; TLC) ใช้ Silica gel 60 F₂₅₄ จากบริษัท Merck ซึ่งสามารถติดตามสารบนที่แอลซีได้ด้วยรังสี UV ที่ความยาวคลื่น (λ) 254 nm และซิลิกาเจลสำหรับการแยกสารให้บริสุทธิ์ถูกซื้อมาจากบริษัท Merck

ข้อมูลนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) ของธาตุไอโซโทปของโมเลกุล ^1H , ^{13}C และ ^{19}F ถูกบันทึกด้วยเครื่อง Bruker AVANCE 300 spectrometer (300 MHz สำหรับ ^1H NMR, 75 MHz สำหรับ ^{13}C NMR และ 282 MHz สำหรับ ^{19}F NMR) โดยใช้ตัวทำละลาย CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ และ $\text{acetone}-d_6$ แสดง chemical shift ในหน่วย ppm., มีค่า coupling constant (*J*) แสดงในหน่วย Hertz (Hz) และแสดง multiplicity ซึ่งถูกอธิบายด้วย *s* =

singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad สำหรับตัวทำละลาย CDCl₃ ใช้ Tetramethylsilane (TMS) เป็น internal standard สำหรับ ¹H, ¹³C-NMR set ที่ chemical shift เท่ากับ 0 ppm, ตัวทำละลาย DMSO-*d*₆ set ที่ chemical shift เท่ากับ 2.50 ppm และ 39.5 ppm สำหรับ ¹H และ ¹³C NMR ตามลำดับ และใช้ CF₃COOH เป็น internal standard สำหรับ ¹⁹F-NMR set ที่ chemical shift เท่ากับ -76.55 ppm, และตัวทำละลาย acetone-*d*₆ set ที่ chemical shift 2.06 ppm และ 29.9 ppm สำหรับ ¹H และ ¹³C NMR ตามลำดับ

ข้อมูลมวลของโมเลกุลถูกบันทึกค่ามวลต่อประจุ (mass/charge; m/z) ด้วยเครื่อง Bruker Daltonics - microTOF โดยใช้ ESI positive mode

จุดหลอมเหลว (melting point) ของผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็งหาได้จากเครื่องหาจุดหลอมเหลว Stuart scientific melting point apparatus SMP2

General procedure A: Synthesis of various phenyl azides using diazotization and substitution.

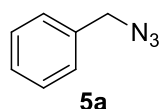
To a stirred solution of aniline (**14b-14q**) in 50% aqueous HCl solution below 0 °C was treated with a solution of sodium nitrite in water dropwise, while maintaining the temperature of the reaction mixture below 0°C. The reaction mixture was stirred at this temperature for 30 min. Then, it was added to a stirred solution of sodium azide in water which was cooled below 5 °C. The resulting mixture was stirred to complete reaction for about 30 min. After this time, the reaction mixture was diluted with H₂O (30 mL) and extracted with DCM (3 x 50 mL). The combined organic phase was washed with brine (1 x 50 mL) and dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to afford the corresponding phenyl azide derivatives (**5b-5q**). The product was used in the next step without further purification.³²

General procedure B: Construction of 1,2,3-triazole ring using Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition.

To a stirred suspension of azide **5a-5q**, alkyne **7** or **13**, and sodium ascorbate in *n*-BuOH:H₂O (1:1, 3 mL) was added 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution at room temperature. The reaction mixture was stirred at 65 °C for 2 h. After that, H₂O (5 mL) and 10% v/v aqueous NH₃ solution (2.5 mL) were added to the obtained mixture, which was subsequently extracted with EtOAc (3 x 70 mL). The collected organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography or recrystallization to obtain 1,2,3-triazole compound **8** and **4a-4q**.³³

Synthesis of sorafenib analogue 4a by route 1

benzyl azide (**5a**)



A stirred solution of benzyl bromide (0.50 mL, 4.20 mmol, 1.0 eq) and sodium azide (0.33 g, 5.11 mmol, 1.2 eq) in DMSO (8 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 19 h. After that, the reaction solution was diluted with H₂O (20 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic phase was dried over with anhydrous Na₂SO₄, filtered and removed under reduced pressure afforded benzyl azide (**5a**)³⁴ (0.61 g, 4.58 mmol, quantitative yield) as light yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.32 (s, 2H), 7.10-7.40 (m, 5H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 54.8, 128.2 (2C), 128.3, 128.8 (2C), 135.4.

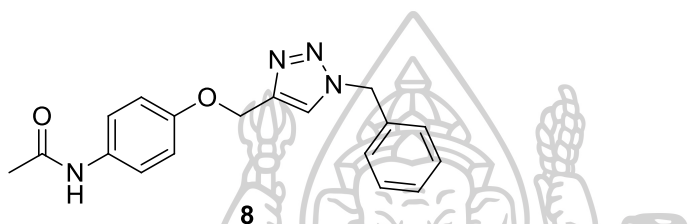
N-acetyl-4-amino-1-propargyloxybenzene (**7**)



To a stirred solution of compound **6** (0.15 g, 0.99 mmol, 1.0 eq) and potassium carbonate (0.17 g, 1.25 mmol, 1.3 eq) in DMF (5 mL) was added propargyl bromide (0.1 mL, 1.20 mmol, 1.2 eq) dropwise at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h. After this time, additional propargyl bromide (0.1 mL, 1.20 mmol, 1.2 eq) was added dropwise and stirred at room temperature for 18 h. The reaction mixture was carefully quenched with H₂O (20 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic phase was washed with brine (1 x 30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica gel column chromatography (silica gel, 60% EtOAc in hexane) to provide *N*-acetyl-4-amino-1-

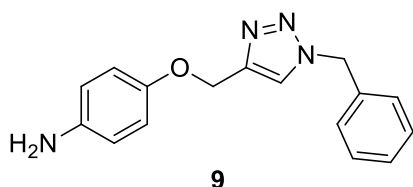
propargyloxybenzene (**7**) (96.3 mg, 0.51 mmol, 77%) as white solid. Mp. = 121-124 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.10 (s, 3H), 2.52 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 4.64 (d, J = 2.1 Hz, 2H), 6.88 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.13 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 24.1, 56.1, 75.6, 78.6, 115.3 (2C), 122.0 (2C), 132.0, 154.3, 168.9.

N-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)acetamide (**8**)



The synthesis of compound **8** was accomplished smoothly using azide **5a** (66.9 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq), alkyne **7** (94.9 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (5.2 mg, 26 μmol , 0.05 eq), 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (25 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 1 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by recrystallization using water to obtain 1,2,3-triazole **8** (152.6 mg, 0.47 mmol, 95%) as white solid. Mp. = 137-139 °C; ^1H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) δ (ppm): 2.93 (s, 3H), 5.14 (s, 2H), 5.65 (s, 2H), 6.95 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.30-7.42 (m, 5H), 7.56 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.06 (s, 1H), 9.09 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆) δ (ppm): 24.1, 54.2, 62.6, 114.6 (2C), 121.5 (2C), 124.7, 128.9 (2C), 129.1, 129.7 (2C), 134.1, 137.0, 144.8, 155.4, 168.6.

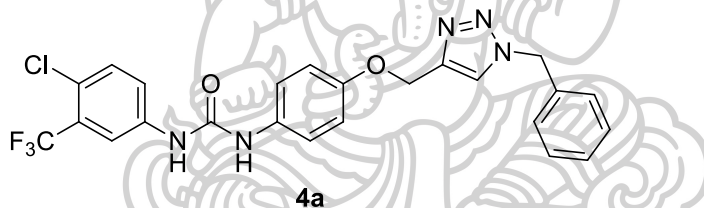
4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)aniline (**9**)



The mixture of *N*-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)acetamide (**8**) (91.9 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) in 2 M aqueous NaOH solution (6 mL) was stirred at 90 °C for 24 h. The resulting solution was diluted with H₂O (30 mL), followed by

addition of 2 M aqueous HCl solution (6 mL). It was extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic phase was washed with brine (1 x 30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 80% EtOAc in hexane) to deliver 4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)aniline (**9**) (71.3 mg, 0.22 mmol, 82%) as white solid. Mp. = 115-117 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.05 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 6.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.20-7.23 (m, 2H), 7.25-7.37 (m, 3H), 7.49 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 54.0, 62.8, 116.1 (2C), 116.3 (2C), 122.7, 128.1 (2C), 128.7, 129.0 (2C), 134.6, 140.7, 144.9, 151.2; HRMS (ESI+, MeOH): *m/z* = 281.1397 [M+H]⁺ calcd. 281.1397 for C₁₆H₁₇N₄O.

1-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4a**)

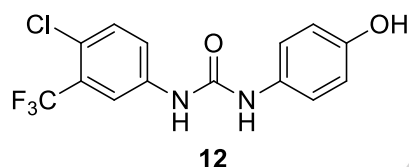


To stirred solution of 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **10** (61.1 g, 0.28 mmol, 1.3 eq) and aniline **9** (60.3 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq) in DCM 4 mL. The mixture solution was stirred at room temperature for 24 h. After this time, the solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude product **4a**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to provide 1-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4a**)¹³ (82.1 mg, 0.16 mmol, 75%) as white solid. Mp. = 204-206 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.09 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.25-7.50 (m, 7H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 9.10 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 52.9, 61.3, 115.0 (2C), 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 120.5 (2C), 122.1 (q, ³*J*_{FC} = 2.3 Hz), 122.8 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 122.9, 124.6, 126.3 (q, ²*J*_{FC} = 30.0 Hz), 127.9 (2C), 128.1, 128.8 (2C), 131.9, 132.5, 136.0, 139.6, 143.2, 152.6, 153.6; ¹⁹F NMR (282 MHz,

DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.83; HRMS (ESI+, MeOH): *m/z* 524.1072 [M+Na]⁺; calcd. 524.1072 for C₂₄H₁₉ClF₃N₅O₂Na.

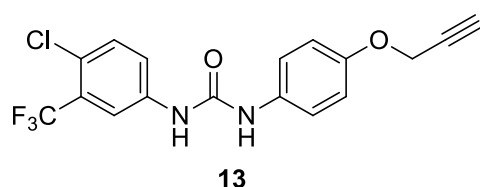
Synthesis of sorafenib analogue 4a by route 2

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)urea (**12**)



To stirred solution of 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **10** (0.5700 g, 2.57 mmol 1.3 eq) and 4-aminophenol (**11**) (0.22 g, 2.0 mmol, 1.0 eq) in DCM 14 mL. The mixture solution was stirred at room temperature for 24 h. After this time, removed under reduced pressure and the crude residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% EtOAc/hexane) to provide 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)urea (**12**)¹³ (0.5600 g, 1.70 mmol, 85%) as white solid. Mp. = 223-225 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6.71 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.50-7.65 (m, 2H), 8.09 (br s, 1H), 8.48 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 115.7 (2C), 117.1 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 121.7 (2C), 122.5 (q, ³*J*_{FC} = 2.3 Hz), 123.3, 123.3 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 127.1 (q, ²*J*_{FC} = 30.0 Hz), 130.8, 132.4, 140.0, 153.2, 153.4; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.13; HRMS (ESI+, MeOH): *m/z* = 353.0275 [M+Na]⁺calcd. 353.0281 for C₁₄H₁₀ClF₃N₂O₂Na.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)urea (**13**)

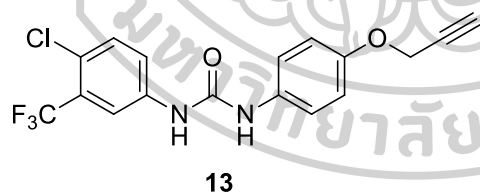


Propargyl bromide (0.15 mL, 1.68 mmol, 1.2 eq) and K₂CO₃ (0.52g, 1.58 mmol, 1.0 eq) were added to a stirred solution of phenol **12** (0.15 g, 0.99 mmol, 1.0 eq) in DMSO (5 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at this

temperature further for 8 h. After that, the reaction was carefully quenched with H₂O (10 mL) and extracted with diethyl ether (3 x 30 mL). The combined organic phase was washed with brine (1 x 30 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash silica gel column chromatography (silica gel, 60% EtOAc in hexane) to provide 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)urea (**13**)³³ (0.39 g, 1.05 mmol, 80%) as white solid. Mp. = 195-197 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.54 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 9.09 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 55.6, 78.1, 79.6, 115.3 (2C), 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 120.6 (2C), 122.2 (q, ³*J*_{FC} = 2.3 Hz), 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 123.0, 126.7 (q, ²*J*_{FC} = 30.0 Hz), 132.1, 133.0, 139.6, 152.7, 152.8; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.03; HRMS (ESI+, MeOH): *m/z* = 391.0432 [M+Na]⁺; calcd. 391.0437 for C₁₇H₁₂ClF₃N₂O₂Na.

Alternative synthesis of alkyne **13** from isocyanate **10** (alkyne **13** was purified in single step)

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)urea (**13**)

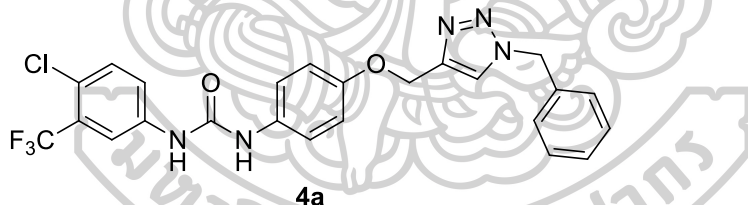


A stirred solution of 4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate **10** (3.2100 g, 14.49 mmol, 1.05 eq) and 4-aminophenol (**11**) (1.5081 g, 13.82 mmol, 1.0 eq) in DCM (90 mL) was stirred at room temperature for 1 h. After this time, the solvent was evaporated under reduced pressure to give the crude product **12**.¹³ Propargyl bromide (1.5 mL, 16.80 mmol, 1.2 eq) and K₂CO₃ (2.3221 g, 16.80 mmol, 1.0 eq) were added to a stirred solution of compound **12** (1.5106 g, 13.80 mmol) in DMSO (60 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at this temperature further for

8 h.³³ After that, the reaction was carefully quenched with H₂O (50 mL) and extracted with EtOAc (3 x 120 mL). The combined organic phase was washed with brine (1 x 50 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 30% EtOAc in hexane) to provide 1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)urea (**13**) (4.28 g, 11.6 mmol, 84% over two steps) as light yellow solid. Mp. = 195-197 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.54 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.93 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.62 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 9.13 (s, 1H).

Remark: The obtained ¹H NMR spectrum of **13** prepared with this route agreed with the spectrum of **13** in previous synthesis.

1-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4a**)

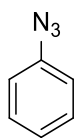


The synthesis of compound **4a** was accomplished smoothly using azide **5a** (70.3 mg, 0.53 mmol, 1.2 eq), alkyne **13** (160.0 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (4.4 mg, 22 μ mol, 0.05 eq), 1M CuSO₄·5H₂O (22 μ L) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 1.6 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by recrystallization to obtain 1-(4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4a**) (0.19 g, 0.38 mmol, 89%) as white-gray solid. Mp. = 204-206 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.09 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.25-7.50 (m, 7H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 6.9, 2.1 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 9.14 (s, 1H).

Remark: The obtained ^1H NMR spectrum of **4a** prepared with this route agreed with the spectrum of **4a** synthesized by the route 1.

Synthesis of various sorafenib analogues 4b-4s

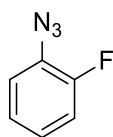
Azidobenzene (**5b**)



5b

Azidobenzene (**5b**) was prepared successfully using aniline **14b** (0.30 mL, 3.28 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (346.9 mg, 5.02 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (5 mL) and a solution of sodium azide (433.3 mg, 6.67 mmol, 2.0 eq) in water (5 mL) as described in the **general procedure A**. The desired azidobenzene (**5b**)³⁵ (393.4 mg, 3.30 mmol, 100% yield) was obtained as brown oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.94 (dd, $J = 8.7, 1.2$ Hz, 2H), 7.06 (tt, $J = 8.4, 1.2$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 119.1 (2C), 124.9, 129.8 (2C), 140.1.

1-Azido-2-fluorobenzene (**5c**)

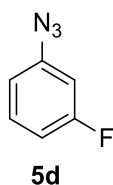


5c

1-Azido-2-fluorobenzene (**5c**) was prepared successfully using aniline **14c** (0.9965 g, 8.97 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (1.0578 g, 15.33 mmol, 1.7 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (1.0578 g, 16.27 mmol, 1.8 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-

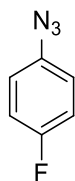
azido-2-fluorobenzene (**5c**)³⁶ (1.3270 g, 9.68 mmol, 99% yield) was obtained as light yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.18 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 117.1 (d, ²J_{FC} = 18.0 Hz), 121.6, 125.9 (d, ³J_{FC} = 3.8 Hz), 126.7 (d, ³J_{FC} = 7.5 Hz), 127.5 (d, ²J_{FC} = 10.5 Hz), 154.3 (d, ¹J_{FC} = 245.3 Hz); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO- d₆) δ (ppm): -128.75.

1-Azido-3-fluorobenzene (**5d**)



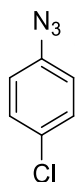
1-Azido-3-fluorobenzene (**5d**) was prepared successfully using aniline **14d** (1.0000 g, 9.00 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.8775 g, 13.50 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.9315 g, 13.50 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-3-fluorobenzene (**5d**) (1.0752 g, 7.84 mmol, 87% yield) was obtained as colorless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.84 (dt, J = 10.1 Hz, 1H), 6.93 (ddd, J = 8.1 Hz, J = 2.1 Hz, J = 0.8 Hz, 1H), 6.93 (tdd, J = 8.6 Hz, J = 2.4 Hz, J = 0.8 Hz, 1H), 7.37 (dt, J = 8.4 Hz, J = 6.9 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 106.7 (d, ²J_{FC} = 25.5 Hz), 111.9 (d, ²J_{FC} = 21.0 Hz), 114.7 (d, ³J_{FC} = 3.0 Hz), 130.9 (d, ³J_{FC} = 9.8 Hz), 141.9 (d, J = 9.8 Hz), 163.5 (d, ¹J_{FC} = 246.0 Hz); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): -113.00.

1-Azido-4-fluorobenzene (**5e**)

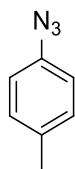
**5e**

1-Azido-4-fluorobenzene (**5e**) was prepared successfully using aniline **14e** (1.0000 g, 9.00 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.8775 g, 13.5 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.9315 g, 13.50 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-4-fluorobenzene (**5e**)³⁵ (1.0137 g, 7.39 mmol, 82% yield) was obtained as light yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.95-7.26 (m, 4H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 116.7 (d, ²J_{FC} = 23.3 Hz, 2C), 120.4 (d, ³J_{FC} = 8.3 Hz, 2C), 135.8 (d, ⁴J_{FC} = 3.0 Hz), 160.0 (d, ¹J_{FC} = 243.0 Hz).

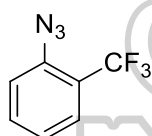
1-Azido-4-chlorobenzene (**5f**)

**5f**

1-Azido-4-chlorobenzene (**5f**) was prepared successfully using aniline **14f** (0.5008 g, 3.94 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (1.0827 g, 15.69 mmol, 4.0 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.5116 g, 7.87 mmol, 2.0 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-4-chlorobenzene (**5f**)³⁶ (0.5336 g, 3.47 mmol, 90% yield) was obtained as light yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.22 (td, *J* = 9 Hz, *J* = 3 Hz, 2H), 7.25 (td, *J* = 9 Hz, *J* = 3 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 120.2 (2C), 129.8 (2C), 130.2, 138.7.

1-Azido-4-methylbenzene (**5g**)**5g**

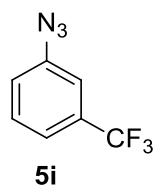
1-Azido-4-methylbenzene (**5g**) was prepared successfully using aniline **14g** (1.000 g, 9.33 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.9656 g, 13.99 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.9097 g, 14.00 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-4-methylbenzene (**5g**)³⁷ (0.9814 g, 7.37 mmol, 79% yield) was obtained as light yellow oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.30 (s, 3H), 6.89 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 9.0 Hz, 2H).

**5h**1-Azido-2-(trifluoromethyl)benzene (**5h**)

1-Azido-2-(trifluoromethyl)benzene (**5h**) was prepared successfully using aniline **14h** (1.0025 g, 6.22 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.6438 g, 9.33 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.6065 g, 9.33 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-2-(trifluoromethyl)benzene (**5h**) (0.5595 g, 2.99 mmol, 48% yield) was obtained as colourless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.35 (br d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (br d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.71 (br d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.7 (br t, J = 7.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 119.3 (q, ² J_{FC} = 30.8 Hz), 120.6, 123.1 (q, ¹ J_{FC} = 270.8

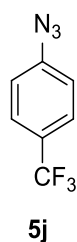
Hz), 125.0, 127.1 (q, $^3J_{FC} = 5.3$ Hz), 134.1, 137.91 (q, $^4J_{FC} = 0.8$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -62.04.

1-Azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**5i**)



1-Azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**5i**) was prepared successfully using aniline **14i** (1.0581 g, 6.57 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.6799 g, 9.85 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.6406 g, 9.86 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**5i**)³⁷ (0.4918 g, 2.63 mmol, 40% yield) was obtained as colourless oil. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.35 (dd, $J = 2.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.43 (ddd, $J = 8.0, 1.3, 0.6$ Hz, 1H), 7.51 (dt, $J = 7.8, 0.7$ Hz, 1H), 7.63 (br t, $J = 7.9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 115.8 (q, $^3J_{FC} = 3.8$ Hz), 121.5 (q, $^3J_{FC} = 4.5$ Hz), 123.1, 123.6 (q, $^1J_{FC} = 270.8$ Hz), 130.7 (q, $^2J_{FC} = 32.3$ Hz), 131.1, 140.7; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.36.

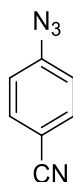
1-Azido-4-(trifluoromethyl)benzene (**5j**)



1-Azido-4-(trifluoromethyl)benzene (**5j**) was prepared successfully using aniline **14j** (0.9774 g, 6.07 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.6278 g, 9.10 mmol, 1.5 eq)

in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.5915 g, 9.10 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-4-(trifluoromethyl)benzene (**5j**)³⁸ (0.5225 g, 2.79 mmol, 46% yield) was obtained as colourless oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 119.79 (2C), 124.07 (q, $^1J_{FC} = 270.0$ Hz), 125.39 (q, $^2J_{FC} = 32.3$ Hz), 127.02 (q, $^3J_{FC} = 3.8$ Hz, 2C), 143.74 (q, $^4J_{FC} = 0.8$ Hz); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): -62.04.

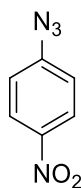
4-Azidobenzonitrile (**5k**)



5k

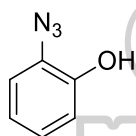
4-Azidobenzonitrile (**5k**) was prepared successfully using aniline **14k** (0.9987 g, 8.45 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.8814 g, 12.77 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.8427 g, 12.96 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 4-azidobenzonitrile (**5k**) **36** (1.1237 g, 7.80 mmol, 92% yield) was obtained as light yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.77 (m, 2H), 7.66 (m, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 108.3, 118.4, 119.8 (2C), 133.9 (2C), 144.9.

1-Azido-4-nitrobenzene (**5l**)

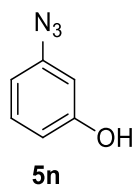
**5l**

1-Azido-4-nitrobenzene (**5l**) was prepared successfully using aniline **14l** (1.0109 g, 7.32 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (1.0535 g, 15.27 mmol, 2.1 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.9473 g, 14.57 mmol, 2.0 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 1-azido-4-nitrobenzene (**5l**)³⁵ (1.1661 g, 7.11 mmol, 97% yield) was obtained as yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.14 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 9.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 119.4 (2C), 125.9 (2C), 144.7, 146.9.

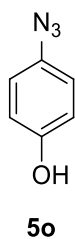
2-Azidophenol (**5m**)

**5m**

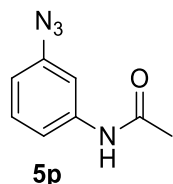
2-Azidophenol (**5m**) was prepared successfully using aniline **14m** (0.9978 g, 9.15 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (0.9453 g, 13.70 mmol, 1.5 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.8905 g, 13.70 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 2-azidophenol (**5m**)³⁹ (1.1489 g, 8.51 mmol, 93% yield) was obtained as dark violet oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.49 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 6.61 (dt, J = 9.0 Hz, J = 2.4 Hz, 2H), 7.18 (t, J = 9.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 106.3, 111.5, 112.2, 130.8, 141.4, 156.7.

3-Azidophenol (**5n**)

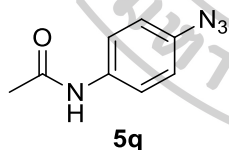
3-Azidophenol (**5n**) was prepared successfully using aniline **14n** (1.0775 g, 9.87 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (1.0376 g, 15.04 mmol, 1.5eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.9783 g, 15.05 mmol, 1.5 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 3-azidophenol (**5n**)³⁹ (1.1489 g, 8.51 mmol, 93% yield) was obtained as dark violet oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.49 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.61 (dt, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 2H), 7.18 (t, $J = 9$ Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 106.3, 111.5, 112.2, 130.8, 141.4, 156.7.

4-Azidophenol (**5o**)

4-Azidophenol (**5o**) was prepared successfully using aniline **14o** (1.0896 g, 9.98 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (2.1148 g, 30.65 mmol, 3.1 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (1.5784 g, 24.28 mmol, 2.4 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired 4-azidophenol (**5o**)³⁹ (1.3782 g, 10.19 mmol, quantitative yield) was obtained as dark purple oil. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.81 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 9.57 (bs, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 116.8 (2C), 120.2 (2C), 129.9, 155.2.

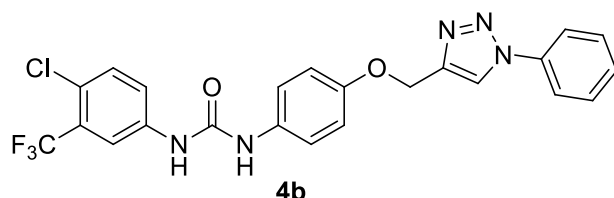
N-(3-Azidophenyl)acetamide (**5p**)

N-(3-Azidophenyl)acetamide (**5p**) was prepared successfully using aniline **14p** (1.0100 g, 6.72 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (1.3500 g, 19.56 mmol, 2.9 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.8200 g, 12.61 mmol, 1.9 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired *N*-(3-azidophenyl)acetamide (**5p**) (0.8841 g, 5.02 mmol, 76% yield) was obtained as yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.17 (s, 3H), 6.76 (br d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.19 (br d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.34 (br s, 1H), 7.80 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 24.5, 110.6, 114.7, 116.2, 130.1, 139.3, 140.8, 168.8.

N-(4-Azidophenyl)acetamide (**5q**)

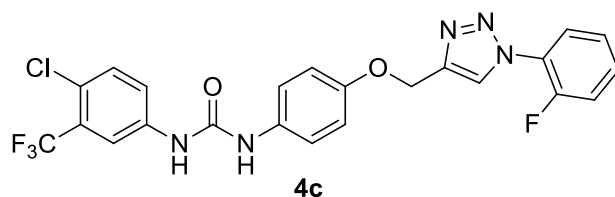
N-(4-Azidophenyl)acetamide (**5q**) was prepared successfully using aniline **14q** (1.0000 g, 6.66 mmol, 1.0 eq), sodium nitrite (1.3500 g, 19.57 mmol, 2.9 eq) in 50% aqueous HCl solution (10 mL) and a solution of sodium azide (0.8820 g, 13.56 mmol, 2.0 eq) in water (10 mL) as described in the **general procedure A**. The desired *N*-(4-azidophenyl)acetamide (**5q**) (1.0323 g, 5.86 mmol, 88% yield) was obtained as yellow solid. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.15 (s, 3H), 7.05 (td, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 2H), 7.62 (td, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 2H), 7.69 (br s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 24.4, 119.4 (2C), 121.5 (2C), 134.9, 135.8, 168.6.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-phenyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4b**)



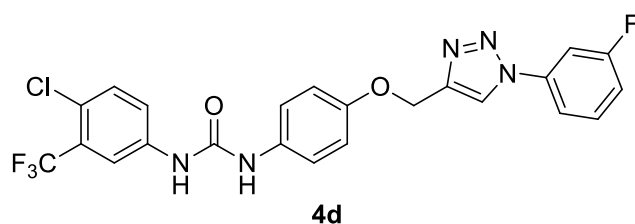
The synthesis of compound **4b** was accomplished smoothly using azide **5b** (142.5 mg, 1.2 mmol, 2.0 eq), alkyne **13** (225.3 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (7.3 mg, 0.037 mmol, 0.06 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (34 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4b** (296.5 mg, 0.61mmol, 100% yield) as gray-white solid. Mp. = 227-228 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.20 (s, 2H), 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.50 (tt, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.55-7.66 (m, 4H), 7.92 (dt, *J* = 9.0 , 3.0 Hz, 2H), 8.10 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 9.09 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆); δ (ppm): 61.3, 115.0 (2C), 116.5 (q, ³*J*_{FC} = 5.7 Hz), 120.2 (2C), 120.5 (2C), 122.0 (q, ³*J*_{FC} = 2.3 Hz), 122.8, 122.9 (2C), 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 126.7 (q, ²*J*_{FC} = 30 Hz), 128.8, 129.9, 132.0, 132.6, 136.6, 139.6, 144.0, 152.6, 153.5; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.68; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 510.0915 [M+Na]⁺; calcd. 510.0915 for C₂₃H₁₇ClF₃N₅O₂Na.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(2-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4c**)



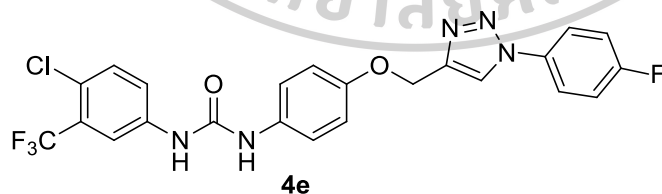
The synthesis of compound **4c** was accomplished smoothly using azide **5b** (180.2 mg, 1.31 mmol, 2.0 eq), alkyne **13** (240.4 mg, 0.65 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (7.1 mg, 0.036 mmol, 0.06 eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (36 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4c** (296.5 mg, 0.61 mmol, 100% yield) as white solid. Mp. = 222-224 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.22 (s, 2H), 7.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.45 (td, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.57 (td, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.58-7.67 (m, 3H), 7.86 (td, *J* = 9.0 Hz, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.73 (d, *J* = 3.0 Hz 1H), 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.1, 115.0 (2C), 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 117.4 (d, ²*J*_{FC} = 11.3 Hz), 120.5 (2C), 122.1 (q, ³*J*_{FC} = 2.4 Hz), 122.9, 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 277.5 Hz), 124.7, 125.6 (d, ³*J*_{FC} = 3.8 Hz), 126.0, 126.1 (d, ³*J*_{FC} = 3.0 Hz), 126.7 (q, ²*J*_{FC} = 30.8 Hz), 131.4 (d, ²*J*_{FC} = 8.3 Hz), 132.0, 132.7, 139.6, 143.5, 152.6, 153.5 (d, ⁴*J*_{FC} = 0.8 Hz), 153.9 (d, ¹*J*_{FC} = 249.0 Hz); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -125.88 (s, 1F), -63.31 (s, 3F); HRMS (ESI+, MeOH) : *m/z* 528.0823 [M+Na]⁺; calcd. 528.0821 for C₂₃H₁₆ClF₄N₅O₂Na.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(3-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4d**)



The synthesis of compound **4d** was accomplished smoothly using azide **5d** (178.3 mg, 1.30 mmol, 2.0 eq), alkyne **13** (238.7 mg, 0.65 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (8.3 mg, 0.041 mmol, 0.06 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (45 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 40% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4d** (286.1 mg, 0.57 mmol, 88% yield) as light brown solid. Mp. = 222-224 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.20 (s, 2H), 7.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.13 (td, *J* = 9.0, 1.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.55-7.69 (m, 3H), 7.83 (tt, *J* = 12.0 Hz, *J* = 3.0 Hz, 2H), 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.3, 107.7 (d, ²*J*_{FC} = 26.3 Hz), 115.1 (2C), 115.6 (d, ²*J*_{FC} = 21.0 Hz), 116.1 (q, ³*J*_{FC} = 3.0 Hz), 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 120.6 (2C), 122.1 (q, ³*J*_{FC} = 2.4 Hz), 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 271.2 Hz), 123.0 (2C), 126.8 (q, ²*J*_{FC} = 30.3 Hz), 131.9, 132.0, 132.7, 137.8 (d, ³*J*_{FC} = 10.4 Hz), 139.6, 144.3, 152.7, 153.5, 162.5 (d, ¹*J*_{FC} = 243.8 Hz); ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -112.35 (s, 1F), -63.30 (s, 3F); HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 528.0823 [M+Na]⁺; calcd. 528.0821 for C₂₃H₁₆ClF₄N₅O₂Na.

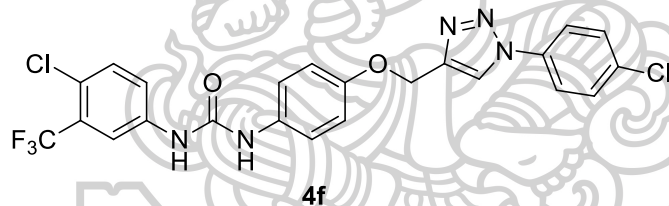
1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(4-fluorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4e**)



The synthesis of compound **4e** was accomplished smoothly using azide **5d** (85.5 mg, 0.624 mmol, 1.0 eq), alkyne **13** (230.0 mg, 0.624 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (6.2 mg, 0.031 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (31 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to

obtain 1,2,3-triazole derivatives **4e** (292.5 mg, 0.58 mmol, 93% yield) as white solid. Mp. = 221-223 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 5.20 (s, 2H), 7.03 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.46 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.59 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.96 (dt, $J = 9.0, 3.5$ Hz, 2H), 8.11 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 61.3, 115.0 (2C), 116.3 (q, $^3J_{\text{FC}} = 6$ Hz), 116.8 (d, $^2J_{\text{FC}} = 23.3$ Hz, 2C), 120.5 (2C), 122.1 (q, $^3J_{\text{FC}} = 2.3$ Hz), 122.6 (d, $^3J_{\text{FC}} = 9.0$ Hz, 2C), 122.8 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271.5$ Hz), 122.9, 123.1, 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}} = 30.8$ Hz), 132.0, 132.7, 133.1 (d, $^4J_{\text{FC}} = 2.3$ Hz), 139.6, 144.1, 152.6, 153.5, 161.7 (d, $^1J_{\text{FC}} = 244.5$ Hz); ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): -114.80 (s, 1F), -63.35 (s, 3F); HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 506.1007 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. 506.1002 for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{ClF}_4\text{N}_5\text{O}_2$.

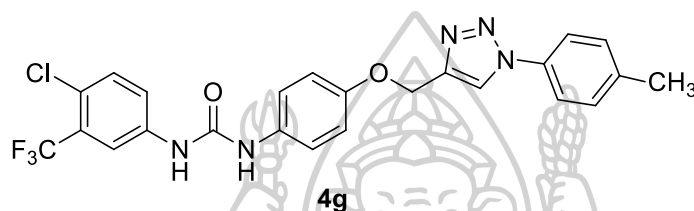
1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(4-chlorophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4f**)



The synthesis of compound **4f** was accomplished smoothly using azide **5f** (218.1 mg, 1.42 mmol, 2.0 eq), alkyne **13** (262.8 mg, 0.71 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (10.1 mg, 0.051 mmol, 0.07 eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (36 μL) and $n\text{-BuOH:H}_2\text{O}$ (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivatives **4f** (361.8 mg, 0.70 mmol, 98% yield) as light yellow solid. Mp. = 227-229 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 5.19 (s, 2H), 7.02 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.52-7.63 (m, 2H), 7.65 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.09 (br s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 9.12 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 61.3, 115.0 (2C), 116.4 (q, $^3J_{\text{FC}} = 5.3$ Hz), 120.5 (2C), 121.8 (2C), 122.1 (q, $^3J_{\text{FC}} = 2.4$ Hz), 122.8 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271.5$ Hz), 122.8, 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}} =$

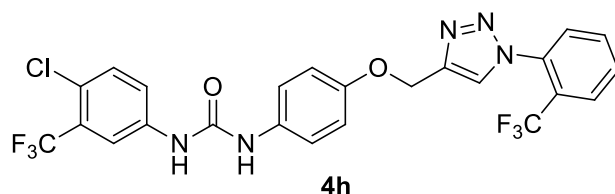
30.0 Hz), 129.9 (2C), 131.9, 132.7, 133.0, 135.4, 139.6, 144.2, 152.6, 153.5; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): -63.38; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 544.0525 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. 544.0525 for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_2\text{Na}$.

1-(3-chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(*p*-tolyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4g**)



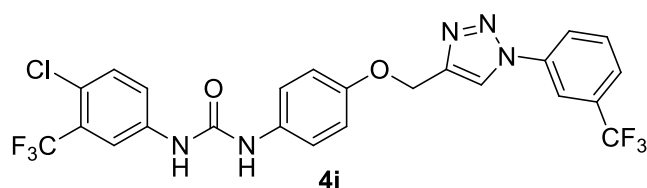
The synthesis of compound **4g** was accomplished smoothly using azide **5g** (83.1 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq), alkyne **13** (230.0 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (6.2 mg, 0.031 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (31 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivative **4g** (241.9 mg, 0.48 mmol, 77% yield) as gray-white solid. Mp. = 227-229 °C; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 2.38 (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 7.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.64 (dd, J = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 9.14 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 20.7, 61.3, 115.1 (2C), 116.7 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 6.0 Hz), 120.1 (2C), 120.7 (2C), 122.2 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 2.4 Hz), 122.8, 122.9 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 271.5 Hz), 123.0, 126.8 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 30.8 Hz), 130.4 (2C), 132.0, 132.7, 134.4, 138.5, 139.6, 144.0, 152.7, 153.6; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): -64.34.; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 502.1255 $[\text{M}+\text{H}]^+$; calcd. 502.1253 for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}_2$.

1-(3-chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(2-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4h**)



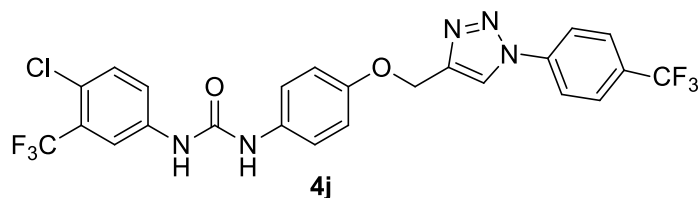
The synthesis of compound **4h** was accomplished smoothly using azide **5h** (153.4 mg, 0.82 mmol, 1.5 eq), alkyne **13** (203.2 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (5.5 mg, 0.028 mmol, 0.05eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (28 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4h** (241.9 mg, 0.48 mmol, 77% yield) as white solid. Mp. = 233-237 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.23 (s, 2H), 7.03 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 9.0 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.82-7.92 (m, 2H), 8.10 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.23-8.34 (m, 2H), 8.73 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 9.15 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.4, 115.3 (2C), 116.9 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 117.0 (q, ³*J*_{FC} = 16.5 Hz), 120.9 (2C), 122.4 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 123.1 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 123.2, 123.3, 123.8 (q, ¹*J*_{FC} = 270.8 Hz), 124.2, 126.9 (q, ²*J*_{FC} = 30.8 Hz), 130.8 (q, ²*J*_{FC} = 32.9 Hz), 131.1, 132.2, 132.8, 137.2, 139.7, 144.6, 152.9, 153.1 (q, ³*J*_{FC} = 19.5 Hz), 153.7; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.25 (s, 3F), -63.47 (s, 3F); HRMS (ESI+, MeOH) : *m/z* 556.0975 [M+H]⁺; calcd. 556.0970 for C₂₄H₁₇ClF₆N₅O₂.

1-(3-chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4i**)



The synthesis of compound **4i** was accomplished smoothly using azide **5i** (154.6 mg, 0.83 mmol, 1.5 eq), alkyne **13** (201.9 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (5.5 mg, 0.028 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (28 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4i** (230.8 mg, 0.42 mmol, 76% yield) as white solid. Mp. = 233-237 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.21 (s, 2H), 7.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.64 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 8.04 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 9.15 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.2, 115.1 (2C), 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz), 120.5 (2C), 122.1 (q, ³*J*_{FC} = 2.3 Hz), 122.8 (q, ¹*J*_{FC} = 272.3 Hz), 122.9, 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 124.9 (q, ²*J*_{FC} = 31.5 Hz), 126.3 (q, ²*J*_{FC} = 30.8 Hz), 127.3, 127.5 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz), 129.4, 131.2, 132.0, 132.7, 134.1, 134.2 (q, ³*J*_{FC} = 1.5 Hz), 139.6, 143.1, 152.6, 153.6; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.37 (s, 3F), -60.03 (s, 3F); HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 556.0972 [M+H]⁺; calcd. 556.0970 for C₂₄H₁₇ClF₆N₅O₂.

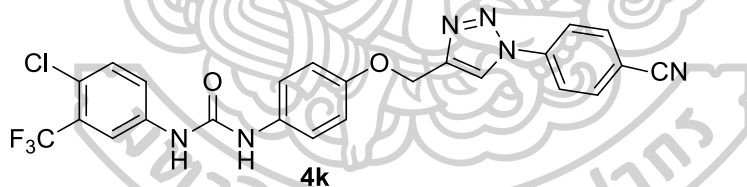
1-(3-chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4j**)



The synthesis of compound **4j** was accomplished smoothly using azide **5j** (153.8 mg, 0.82 mmol, 1.5 eq), alkyne **13** (200.2 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (5.6 mg, 0.028 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (28 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product

was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivatives **4j** (259.3 mg, 0.46 mmol, 86% yield) as white solid. Mp. = 234-238 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5.23 (s, 2H), 7.04 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 9.0 Hz, 1.9 Hz, 1H), 8.00 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.71 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 9.12 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 61.2, 115.1 (2C), 116.7 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 6.0 Hz), 120.56 (2C), 120.64 (2C), 122.1 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 6 Hz), 122.9, 122.9 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 273.0 Hz), 123.1, 123.9 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 273.0 Hz), 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 30.0 Hz), 127.3 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 3.8 Hz, 2C), 128.8 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 32.3 Hz), 132.0, 132.7, 139.4, 139.6, 144.5, 152.6, 153.5; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.34 (s, 3F), -62.89 (s, 3F); HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 556.0973 [M+H] $^+$; calcd. 556.0970 for C₂₄H₁₇ClF₆N₅O₂.

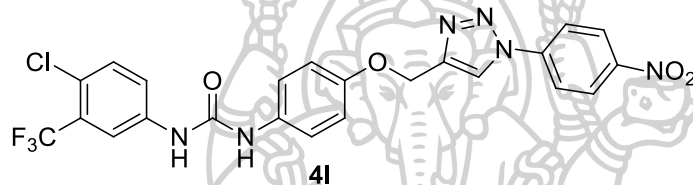
1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(4-cyanophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4k**)



The synthesis of compound **4k** was accomplished smoothly using azide **5k** (191.5 mg, 1.34 mmol, 2.1 eq), alkyne **13** (233.8 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (10.7 mg, 0.054 mmol, 0.07eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (45 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivatives **4k** (282.3 mg, 0.54 mmol, 87% yield) as light yellow solid. Mp. = 227-231 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5.21 (s, 2H), 7.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 3.0 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.17 (d, J = 9.0 Hz,

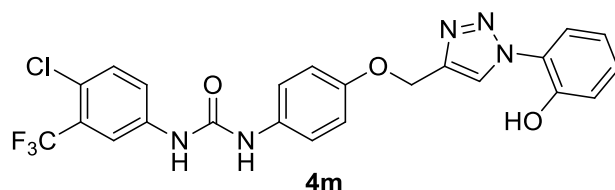
1H), 8.70 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 9.12 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 61.2, 111.1, 115.0 (2C), 116.6 (q, $^3J_{\text{FC}} = 6.0$ Hz), 118.1, 120.5 (4C), 122.0 (q, $^3J_{\text{FC}} = 2.4$ Hz), 122.8 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271.5$ Hz), 122.9, 123.0, 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}} = 30.0$ Hz), 131.9, 132.7, 134.3 (2C), 139.5, 139.6, 144.6, 152.6, 153.4; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.33; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 535.0869 [M+Na] $^+$; calcd. 535.0868 for $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}$.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(4-nitrophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4l**)



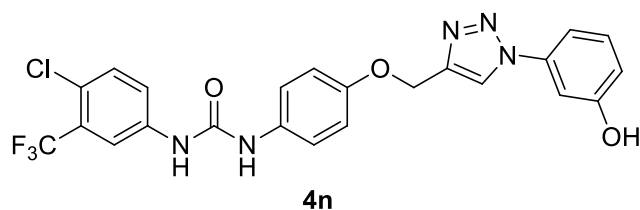
The synthesis of compound **4l** was accomplished smoothly using azide **5l** (201.8 mg, 1.13 mmol, 1.8 eq), alkyne **13** (234.6 mg, 0.64 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (8.1 mg, 0.041 mmol, 0.06 eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (34 μL) and $n\text{-BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivatives **4l** (273.5 mg, 0.51 mmol, 80% yield) as light yellow solid. Mp. = 201-203 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5.22 (s, 2H), 7.02 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.46 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 8.70 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 61.2, 115.0 (2C), 116.6 (q, $^3J_{\text{FC}} = 5.3$ Hz), 120.5 (2C), 120.7 (2C), 122.0 (q, $^3J_{\text{FC}} = 2.4$ Hz), 122.8 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271.5$ Hz), 122.9, 123.2, 125.6 (2C), 127.1 (q, $^2J_{\text{FC}} = 30.0$ Hz), 131.9, 132.7, 139.6, 140.8, 144.7, 146.8, 152.6, 153.4; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.30; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 555.0768 [M+Na] $^+$; calcd. 555.0766 for $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(2-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4m**)



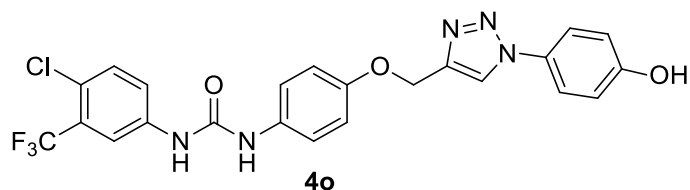
The synthesis of compound **4m** was accomplished smoothly using azide **5m** (112.1 mg, 0.83 mmol, 1.5 eq), alkyne **13** (204.1 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (5.5 mg, 0.028 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (28 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivatives **4m** (255.8 mg, 0.51 mmol, 93% yield) as dark violet solid. Mp. = 218-221 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.20 (s, 2H), 6.99 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.13 (dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.30-7.36 (m, 1H), 7.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.56-7.67 (m, 2H), 7.63 (dd, *J* = 9.2, 2.3 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 10.61 (br s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.2, 115.0 (2C), 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 6.0 Hz), 117.1, 119.6, 120.6 (2C), 122.1 (³*J*_{FC} = 2.4 Hz), 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 270.8 Hz), 123.0, 124.5, 125.3, 126.2, 126.7 (q, ²*J*_{FC} = 30.0 Hz), 130.3, 132.0, 132.6, 139.6, 142.6, 149.8, 152.6, 153.7; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.50. HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 504.1047 [M+H]⁺; calcd. 504.1045 for C₂₄H₁₇ClF₆N₅O₂.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(3-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4n**)



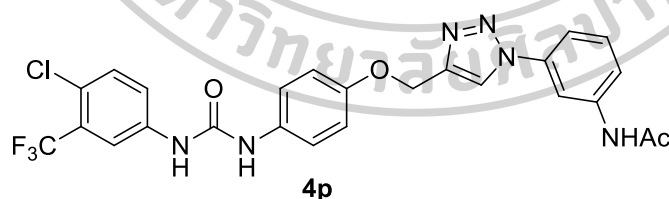
The synthesis of compound **4n** was accomplished smoothly using azide **5n** (163.9 mg, 1.2 mmol, 2.0 eq), alkyne **13** (223.8 mg, 0.61 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (12.0 mg, 0.061 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (30 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole derivatives **4n** (271.3 mg, 0.54 mmol, 89% yield) as white solid. Mp. = 209-211 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.18 (s, 2H), 6.88 (dt, *J* = 7.2 Hz , *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.27-7.36 (m, 3H), 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 9.0 Hz , 1H), 7.63 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 9.13 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.3, 107.1, 110.6, 115.1 (2C), 115.8, 116.7 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz), 120.6 (2C), 122.1 (q, ³*J*_{FC} = 2.4 Hz), 122.8, 122.9 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 123.0, 126.8 (q, ²*J*_{FC} = 30.0 Hz), 130.9, 132.0, 132.7, 137.6, 139.6, 143.9, 152.7, 153.6, 158.5; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): -63.31.; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 526.0864 [M+Na]⁺; calcd. 526.0864 for C₂₃H₁₇ClF₃N₅O₃Na.

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((1-(4-hydroxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)urea (**4o**)



The synthesis of compound **4o** was accomplished smoothly using azide **5o** (147.9 mg, 1.1 mmol, 1.0 eq), alkyne **13** (242.7 mg, 0.658 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (7.8 mg, 0.0340 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (34 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 60% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4o** (322.4 mg, 0.64 mmol, 97% yield) as purple-red solid. Mp. = 235-237 °C ; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 5.17 (s, 2H), 6.93 (dt, *J* = 9.0, 3 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.67 (dt, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 9.96 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): 61.3, 115.0 (2C), 116.1 (2C), 116.6 (q, ³*J*_{FC} = 5.3 Hz), 120.6 (2C), 122.0 (3C), 122.7, 122.9, 123.1 (q, ¹*J*_{FC} = 271.5 Hz), 126.7 (q, ²*J*_{FC} = 30.0 Hz), 128.8, 132.0, 132.6, 139.6, 143.7, 152.6, 153.6, 157.8 ; ¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO-*d*₆) δ(ppm): -63.96; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 526.0865 [M+Na]⁺; calcd. 526.0864 for C₂₃H₁₇ClF₃N₅O₃Na.

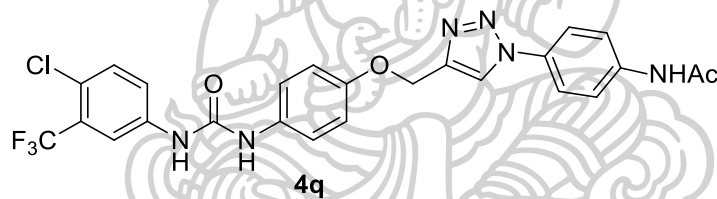
N-(3-(4-((4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (**4p**)



The synthesis of compound **4p** was accomplished smoothly using azide **5p** (147.8 mg, 0.84 mmol, 1.5 eq), alkyne **13** (208.2 mg, 0.56 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (5.5 mg, 0.028 mmol, 0.05 eq), 1M aqueous CuSO₄·5H₂O solution (28 μL) and *n*-BuOH:H₂O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, 80% EtOAc in hexane) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4p** (234.0 mg, 0.44 mmol, 76% yield) as brown solid.

Mp. = 251-254 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.10 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 7.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.49-7.66 (m, 5H), 8.11 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 10.31 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24.1, 61.2, 110.6, 114.5, 115.0 (2C), 116.6 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 6.0 Hz), 118.9, 120.4 (2C), 122.0 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 2.4 Hz), 122.8, 122.9 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 271.5 Hz), 126.8 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 30.0 Hz), 130.2, 132.0, 132.7, 136.8, 139.6, 140.6, 144.1, 152.6, 153.5, 162.5, 168.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.27; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 545.1310 [M+H] $^+$; calcd. 545.1311 for $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_3$.

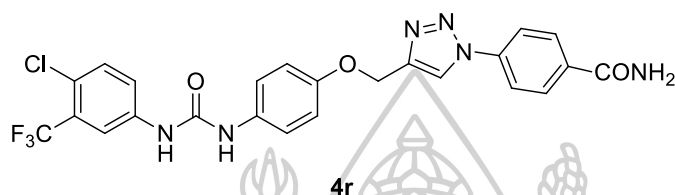
N-(4-(4-((4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)acetamide (**4q**)



The synthesis of compound **4q** was accomplished smoothly using azide **5q** (163.1 mg, 0.93 mmol, 1.5 eq), alkyne **13** (229.9 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq), sodium ascorbate (7.0 mg, 0.035 mmol, 0.06 eq), 1M aqueous $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution (34 μL) and *n*-BuOH:H $_2$ O (1:1; 3 mL) as describe in the **general procedure B**. The crude product was purified by flash column chromatography (silica gel, pure EtOAc) to obtain 1,2,3-triazole delivertives **4q** (317.1 mg, 0.58 mmol, 94% yield) as brown solid. Mp. = 236-238 °C; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 2.08 (s, 3H), 5.18 (s, 2H), 7.02 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, J = 6.9 Hz, J = 2.1 Hz, 1H), 7.82 (td, J = 9.0, 3.0 Hz, 4H), 8.10 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 10.21 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 24.1, 61.3, 115.0 (2C), 116.6 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 6.0 Hz), 119.7 (2C), 120.5 (2C), 120.8 (2C), 122.1 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 2.4 Hz), 122.6, 122.9, 122.9 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 271.5 Hz), 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 30 Hz), 131.6, 132.0, 132.7,

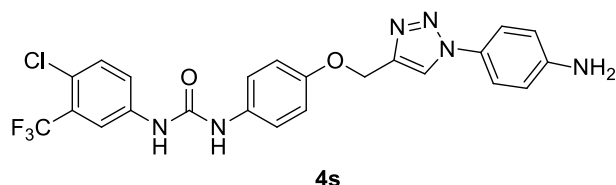
139.6, 139.7, 143.9, 152.6, 153.5, 168.7; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.58; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 567.1130 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. 567.1130 for $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_3\text{Na}$.

4-(4-((4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzamide (**4r**)



A stirred solution of compound **4k** (105.5 mg, 0.21 mmol, 1.0 eq) and K_2CO_3 (41.1 mg, 0.29 mmol, 1.4 eq) in DMSO (1 mL) was added 30% aqueous H_2O_2 solution (60 μL , 2.1 mmol, 10.0 eq) at room temperature. The reaction mixture was stirred at this temperature for 2 h. After that, the reaction solution was diluted with H_2O (30 mL) and extracted with EtOAc (3 x 30mL). The combined organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, 100% EtOAc) to obtain compound **4r** (102.2 mg, 0.19 mmol, 94%) as white solid.³⁴ Mp. = 307-310 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5.22 (s, 2H), 7.03 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.64 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 1H), 8.05-8.11 (m, 3H), 8.16 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 8.73 (s, 1H), 9.07 (s, 1H), 9.15 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 61.3, 115.1 (2C), 116.6 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 6.0 Hz), 119.6 (2C), 120.5 (2C), 122.1, 122.9 (q, $^3J_{\text{FC}}$ = 5.3 Hz), 122.9 (q, $^1J_{\text{FC}}$ = 271.5 Hz), 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}}$ = 30.0 Hz), 129.2 (2C), 132.0, 132.7, 134.2, 138.4, 139.6, 144.3, 152.6, 153.5, 162.5, 166.8; ^{19}F NMR (282 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): -63.56; HRMS (ESI+, MeOH): m/z 553.0973 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; calcd. 553.0974 for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClN}_6\text{O}_3\text{Na}$.

1-(4-((1-(2-aminophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4s**)



A stirred solution of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (184.1 mg, 0.81 mmol, 4.0 eq) in conc. aqueous HCl solution (3 mL) was stirred at 0°C for 5 min and then treated with compound **4l** (108.7 mg, 0.2 mmol, 1.0 eq). The reaction mixture was stirred at 65°C for 2 h. After this time, NaOH (3 mL) and H_2O (30 mL) were added to the reaction mixture. It was extracted with EtOAc (3 x 30 mL). The combined organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, 50% EtOAc in hexane) to obtain compound **4s** (80.6 mg, 0.16 mmol, 80%) as a white solid. Mp. = $219\text{--}223^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 5.15 (s, 2H), 6.78 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.63 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 9.20 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 61.3, 115.0 (2C), 115.1 (2C), 116.7 (q, $^3J_{\text{FC}} = 6.0$ Hz), 120.6 (2C), 121.7 (2C), 122.1 (q, $^3J_{\text{FC}} = 2.4$ Hz), 122.5, 122.9 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271.5$ Hz), 123.0, 126.7 (q, $^2J_{\text{FC}} = 30.0$ Hz), 126.9, 132.0, 132.6, 139.6, 143.5, 147.8, 152.7, 153.6; ^{19}F NMR (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): -63.88; HRMS (ESI+, MeOH) : m/z 525.1024 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; calcd. 525.1024 for $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{ClF}_3\text{N}_6\text{O}_2\text{Na}$.

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็ง

นี้ ำ 1-(4-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4a**) ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิด ลิมโฟยด์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) มะเร็งตับ (HepG2) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

เติมเซลล์มะเร็งจำนวนประมาณ 2×10^4 เซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM ใน 10% FBS ใน หลุมของ 96 well culture plate บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากหลุม แล้วเติมสารละลาย 0.1% ไดเมทิล ซัลโฟไซด์ (dimethylsulfoxide; DMSO) ของ 1-(4-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)-3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)urea (**4a**) หรือ Etoposide หรือ

Doxorubicin hydrochloride เป็นชุดควบคุม ที่ความเข้มข้นต่างๆ บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 mL 0.1 โมลลาร์ น้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline, PBS) solution, pH 7.4 และเติม 0.5 mL 0.04 โมลลาร์ กรดไฮโดรคลอริก (0.04 M hydrochloric acid; 0.04 M HCl) ในไอโซโพรพานอล (isopropanol) เติมสารละลาย 0.5 mg/mL MTT 50 ไมโครลิตรในหลุมเซลล์ บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลาย MTT ออกและละลายผลึกที่เกิดขึ้นด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) 0.5 mL และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570-590 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่า IC_{50} ⁴⁰

และนำโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ **4b-4s** ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay)

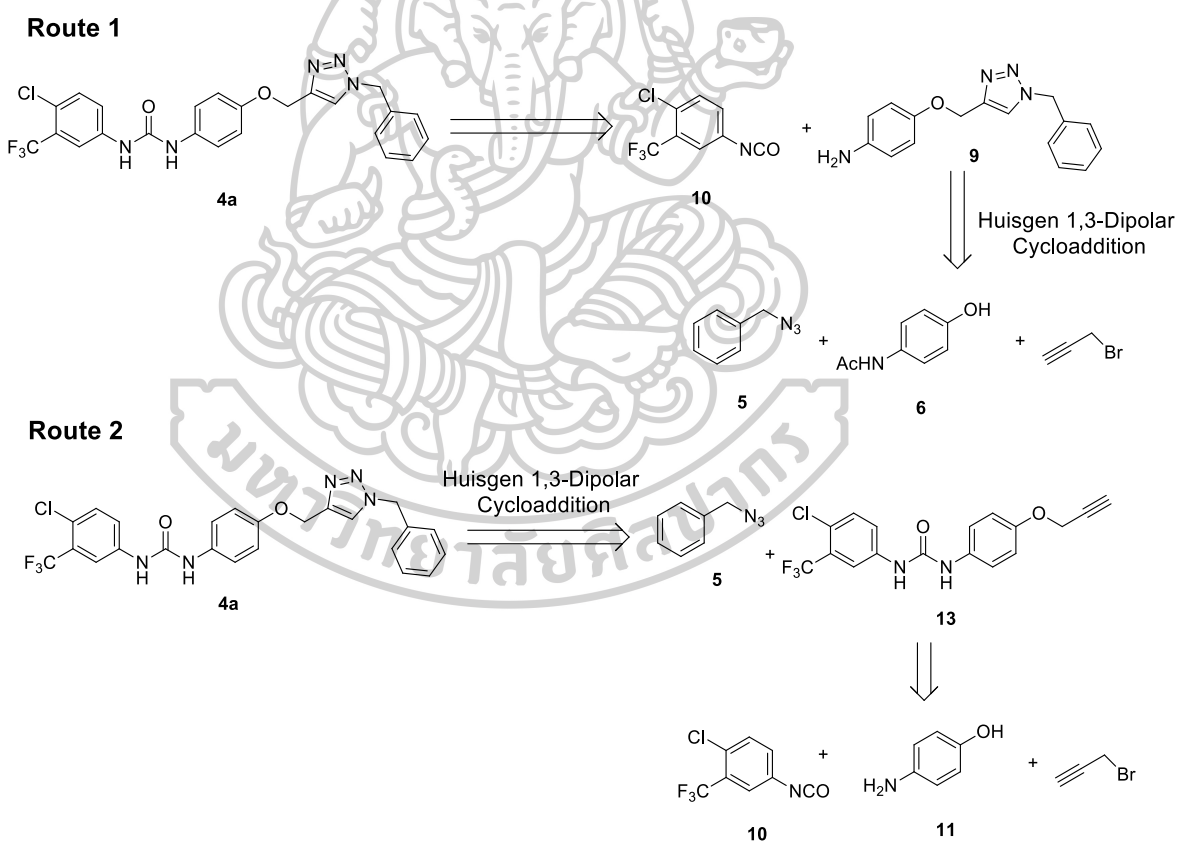
เลี้ยงเซลล์มะเร็งตับ HepG2 หรือ Huh7 ในหลุมของ 96 well culture plate ที่ความเข้มข้น 4.5×10^4 cells/200 μ L ของ DMEM medium culture/well บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ อุณหภูมิ 37 °C ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นละลายยาซอราเฟนิบ และโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ **4b-4r** ด้วยตัวทำละลาย DMSO และเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ จนได้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยมี DMSO 0.1% ต่อมานำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากเซลล์ หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาหรือสารที่สังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นต่างๆลงไป บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.5 mL 0.1 โมลลาร์ น้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline, PBS) solution, pH 7.4 เติมสารละลาย 0.5 mg/mL MTT 100 ไมโครลิตรในหลุมเซลล์ บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำสารละลาย MTT ออกและละลายผลึกที่เกิดขึ้นด้วย DMSO 100 mL และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปหาค่า IC_{50}

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การศึกษาเส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย 4a

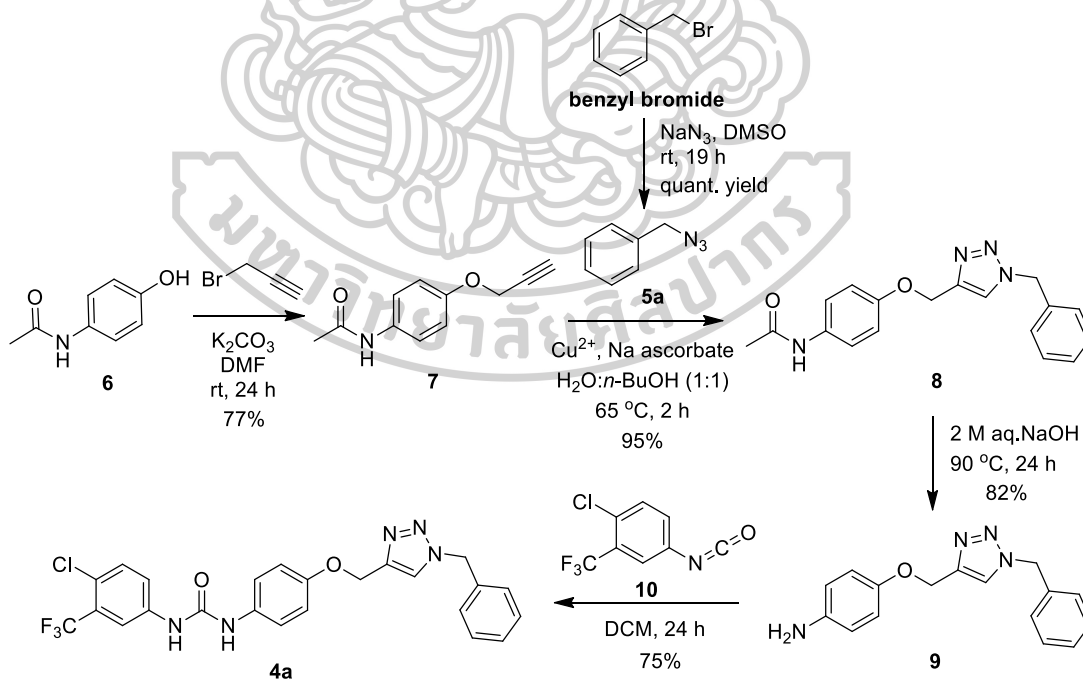
การสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย (4a) สามารถสังเคราะห์ได้ 2 เส้นทาง โดยเส้นทางแรกสามารถสังเคราะห์ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างไอโซไซยาเนต (isocyanate) 10 กับอะมิโน 9 และอะมิโน 9 สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition และโพรพาร์กิลเลชัน (propargylation) เส้นทางที่สอง สามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition ระหว่างแอลไคน์ (alkyne) 13 กับเบนซิลเอไซด์ (5) โดยที่แอลไคน์ (alkyne) 13 สามารถสังเคราะห์ได้จากไอโซไซยาเนต (isocyanate) 10 ฟีนอล (phenol) 11 กับโพรพาร์กิลโบรไมด์ (propargyl bromide) ดังแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 1 Retrosynthetic analysis ของเส้นทางการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอซิลแทนที่วงพิโคลินาไมด์ของซอราเฟนิบ

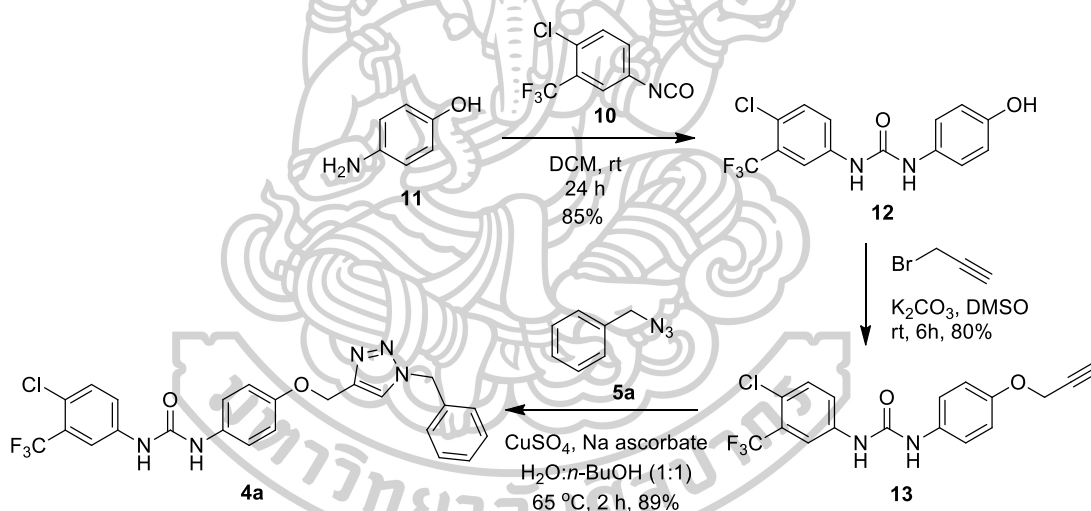
โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลีนาไมด์ของซอราเฟนิบ (4a) สามารถสังเคราะห์ได้ 2 เส้นทาง

เส้นทางที่หนึ่ง โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ 4a ถูกสังเคราะห์ด้วยเส้นทางที่ยาวที่สุด (longest linear sequence) ด้วยปฏิกิริยา 4 ขั้น ดังแสดงในแผนภาพที่ 1 โดยสามารถเริ่มได้จากการนำฟีนอล 6 มาทำปฏิกิริยาโพรพอกิลเลชันด้วยโพรพอกิลโบรไมด์³³ จะได้สารประกอบอัลไคน์ 7 ด้วยผลผลิตร้อยละ 77 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับเบนซิลเอไซด์ (5) ซึ่งสังเคราะห์มาจากเบนซิลโบรไมด์และโซเดียมเอไซด์³² หลังจากนั้นสร้างวงไตรเอโซล โดยจะเกิดผ่านฮุซเกน 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลแอดดิชัน (Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition) โดยมีคอปเปอร์ (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา³³ ทำให้ได้สารประกอบที่มีวงไตรเอโซล 8 ด้วยผลผลิตร้อยละ 95 ต่อมาเอาหมู่อะเซทิลออกในสภาวะเบสจะได้อะนิลีน 9 ด้วยผลผลิตร้อยละ 82 และนำอะนิลีน 9 ไปทำปฏิกิริยากับไอโซไซยาเนต 10 ผ่านปฏิกิริยาการเติมแบบนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic addition)¹³ ก็จะได้โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบเป้าหมาย 4a ด้วยผลผลิตร้อยละ 75 ซึ่งการสังเคราะห์เส้นทางนี้เริ่มต้นจากอะมิโนฟีนอล 6 โดยเส้นทางที่ยาวที่สุดใช้ปฏิกิริยา 4 ขั้น ด้วยผลผลิตรวมร้อยละ 45 ดังแผนภาพที่ 2



แผนภาพที่ 2 เส้นทางที่หนึ่งสำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ **4a** และร้อยละผลผลิต

เส้นทางที่สอง โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ **4a** ถูกสังเคราะห์ด้วยเส้นทางที่ยาวที่สุดด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ดังแสดงในแผนภาพที่ 3 ในขั้นแรกจะเป็นการสังเคราะห์สารประกอบยูโรโดฟินอล **12** จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง 4-อะมิโนฟีนอล (**11**) กับไอโซไซยาเนต **10**¹³ โดยมีผลผลิตร้อยละ 85 หลังจากนั้นนำมาทำปฏิกิริยากับโพรพาซิลโบรไมด์ในสภาวะเบส³³ จะได้สารประกอบอัลไคน์ **13** ด้วยผลผลิตร้อยละ 80 ขั้นตอนสุดท้ายโมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ **4a** สามารถสังเคราะห์ได้ผ่านปฏิกิริยาซุซเกน 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลแอดดิชัน (Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition) ระหว่างอัลไคน์ **13** กับเบนซิลไฮไดรด์ (**5**) โดยมีคอปเปอร์ (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา³³ โดยมีผลผลิตร้อยละ 89 การสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ **4a** ด้วยเส้นทางนี้เริ่มต้นจาก 4-อะมิโนฟีนอล (**11**) โดยเส้นทางที่ยาวที่สุดผ่านปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ด้วยผลผลิตรวมร้อยละ 61 ดังแผนภาพที่ 3



แผนภาพที่ 3 เส้นทางที่สองสำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ **4a** และร้อยละผลผลิต

จากการศึกษาเส้นทางสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบ **4a** พบว่าแต่ละเส้นทางมีความเหมาะสมที่จะสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบที่แตกต่างกัน โดยเส้นทางแรกเหมาะสมที่จะสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบที่ทำการแปรเปลี่ยนหมู่แทนที่/การแทนที่วงฟีนิลเฮไลด์ของชอราเฟนิบ และสำหรับเส้นทางที่สองเหมาะสมที่จะสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบที่ทำการแปรเปลี่ยน/การแทนที่วงฟิโคลินาไมด์ของชอราเฟนิบ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงกว่า เพราะมี

จำนวนชั้นของปฏิกิริยาน้อยกว่าและมีร้อยละผลผลิตรวมสูงกว่าเส้นทางแรก ต่อมาผู้วิจัยต้องการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบโดยแทนที่วงพิโคลินาไมด์ซอราเฟนิบด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซล จึงได้เลือกเส้นทางที่สองมาสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ **4b-4r**

การประเมินผลฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นต่อเซลล์มะเร็งของโมเลกุลเลียนแบบ **4a**

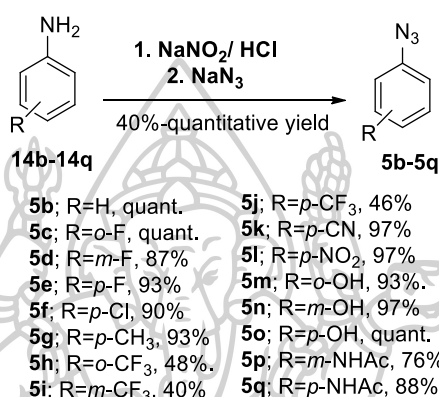
หลังจากประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ **4a** แล้ว จึงได้นำ **4a** ไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 4 ชนิดในหลอดทดลอง ได้แก่ เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) เซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) และเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) ได้ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่แสดงด้วยค่า IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) ดังแสดงในตารางที่ 14 ตารางที่ 14 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองที่แสดงด้วยค่า IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) ในหน่วยไมโครโมลลาร์ (μM) ของโมเลกุลเลียนแบบเป้าหมาย **4a**

เซลล์มะเร็ง	IC_{50} (μM)
MOLT-3	>100
A549	>100
HuCCA-1	>100
HepG2	69.46 \pm 1.12

จากผลการทดสอบพบว่าโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบ **4a** มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 69.46 μM แต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (IC_{50} >100 μM) อีก 3 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟยด์ (MOLT-3) เซลล์มะเร็งปอด (A549) และเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี (HuCCA-1) จึงได้พัฒนาโครงสร้างต่อโดยการเติมหมู่แทนที่ลงบนวงเบนซีนที่ติดกับไตรเอโซลเพื่อเพิ่มแรงยึดเหนี่ยวกับ receptor ทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 ดีขึ้น

การสังเคราะห์อนุพันธ์ฟีนิลเอไซด์ (phenyl azide) **5b-5q**

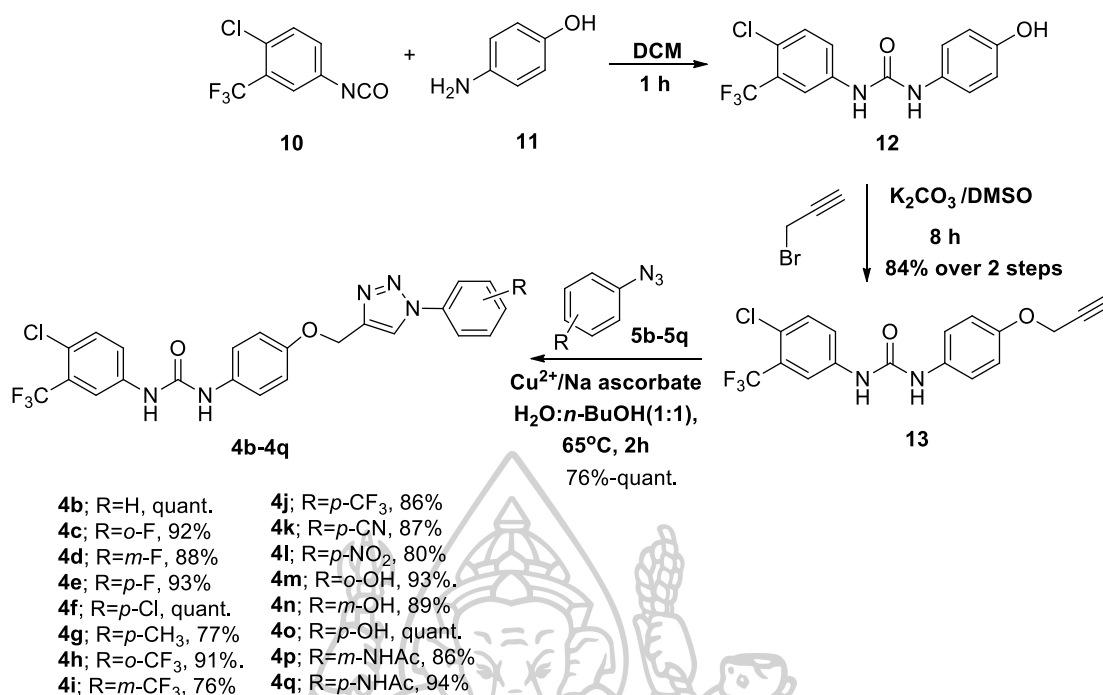
การสังเคราะห์ฟีนิลเอไซด์ (phenyl azide) **5b-5q** สามารถสังเคราะห์ได้จากอนุพันธ์อะนิลีน (aniline derivative) **14b-10q** ผ่านปฏิกิริยาไดอะโซไทเซชัน (diazotization) โดยใช้โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite; NaNO_2) ในสภาวะกรด หลังจากนั้นเกิดการแทนที่แบบนิวคลีโอไฟล์อะโรมาติก (nucleophilic aromatic substitution) ด้วยโซเดียมเอไซด์ (sodium azide; NaN_3) จะได้สารประกอบฟีนิลเอไซด์ (phenyl azide)³² **5b-5q** ที่มีหมู่แทนที่แตกต่างกันและมีร้อยละผลผลิตดังแผนภาพที่ 4



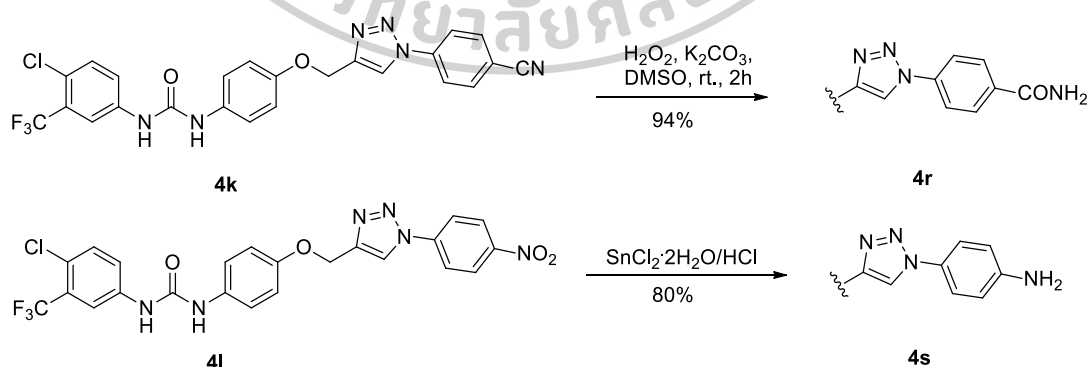
แผนภาพที่ 4 การสังเคราะห์อนุพันธ์ฟีนิลเอไซด์ **5b-5q** และร้อยละผลผลิตที่ได้

การสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบชอราเฟนิบเป้าหมาย 4b-4s

4-อะมิโนฟีนอล (4-aminophenol) (**11**) ทำปฏิกิริยากับ 4-คลอโร-3-(ไตรฟลูออโรเมทิล)ฟีนิลไอโซไซยาเนต (4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl isocyanate; **10**) ในตัวทำละลายไดคลอโรมีเทน (dichloromethane; DCM) จะได้สารประกอบฟีนอล (phenol) **12**¹³ จากนั้นนำฟีนอล (phenol) **12** มาทำปฏิกิริยาโพรพาร์กิลเลชัน (propargylation) กับโพรพาร์กิลโบรมไนด์ (propargyl bromide) ในสภาวะเบส³³ จะได้แอลไคน์ที่มียูเรีย (ureido alkynes) **13** 84% overall yield จากนั้นทำปฏิกิริยา 1,3-dipolar cycloaddition ระหว่างอนุพันธ์ฟีนิลเอไซด์ (phenyl azide derivatives) **5b-5q** กับแอลไคน์ที่มียูเรีย (ureido alkynes) **13** ซึ่งมีโซเดียมแอสคอร์เบต (sodium ascorbate) เป็นตัวรีดิวซ์ และคอปเปอร์ (II) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา³³ จะได้สารผลิตภัณฑ์ **4b-4q** ที่มีหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกัน 76%-quantitative yield โดยรายงานร้อยละผลผลิตดังแผนภาพที่ 5



แผนภาพที่ 5 เส้นทางการสังเคราะห์การสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย **4b-4q** และร้อยละผลผลิตที่ได้ สารประกอบที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นคาร์บอกซาไมด์ (carboxamide; CONH₂) **4r** สามารถสังเคราะห์ได้จากสารประกอบที่มีหมู่ไซยาโน **4k** ทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H₂O₂) ในตัวทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide; DMSO) จะได้โมเลกุลเลียนแบบฮอร์โมนที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลีนาไมด์ของฮอร์โมนที่เป็นโมเลกุลเป้าหมายที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็นคาร์บอกซาไมด์ (carboxamide; CONH₂) **4r**³⁴ โดยมีร้อยละผลผลิต 94 ดังแผนภาพที่ 6



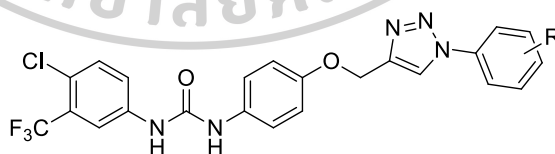
แผนภาพที่ 6 การสังเคราะห์โมเลกุลเป้าหมาย **4r** ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation)³⁴ และ **4s** ด้วยปฏิกิริยารีดักชัน (reduction)³⁵

โมเลกุลเป้าหมายที่มีหมู่อะมิโน (amino; NH₂) **4s** สามารถสังเคราะห์ผ่านปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของหมู่ฟังก์ชันไนโตร (nitro; NO₂) **4l** ด้วยทิน (II) คลอไรด์ ไดไฮเดรต (SnCl₂·2H₂O) ในสภาวะกรด จะได้โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่มีหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซลแทนที่วงพิโคลินาไมด์ของซอราเฟนิบ เป็นโมเลกุลเป้าหมายที่มีหมู่อะมิโน (amino; NH₂) **4s**³⁵ โดยมีร้อยละผลผลิต 80 ดังแผนภาพที่ 6

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับและความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (SARs)

ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ

ผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 ของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่แทนที่วงพิโคลินาไมด์ (picolinamide) ด้วยวง 1,2,3-ไตรเอโซลทั้งหมด 18 โมเลกุล (**4b-4s**) จะถูกนำมาอภิปรายร่วมกับผลการทดสอบฤทธิ์ของนางสาวชนิกานต์ เอี่ยมสอาด (**15a-15m**)⁴¹ โดยที่ผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับดังกล่าวจะต้องทำการ screening ที่ความเข้มข้น 50 µM (cut off) แล้วเลือกโมเลกุลที่มีฤทธิ์ที่ดี (IC₅₀ < 50 µM) มาหาค่า IC₅₀ ในหน่วยไมโครโมลาร์ (micromolar) โดยแสดงดังตารางที่ 15 ซึ่งหาค่าด้วยเทคนิคเอ็มทีที (MTT assay) โดยใช้ซอราเฟนิบเป็นสารมาตรฐาน (positive control) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 3.871 µM และ 2.930 µM สำหรับเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 ตามลำดับ ผลการทดลองการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 แสดงดังตารางที่ 15



15a-15m

รูปภาพที่ 24 โครงสร้างทางเคมีของโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบของนางสาวชนิกานต์ เอี่ยมสอาด (**15a-15m**)⁴¹

ตารางที่ 15 โครงสร้างของโมเลกุลเป้าหมาย (**4b-4s**) และผลการทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 และ Huh7 โดยรายงานผลด้วยค่า IC₅₀ (µM) สำหรับโมเลกุลที่ใช้ในการอภิปรายผลการทดลอง

Cpn.	R	IC ₅₀ (μM)	
		HepG2	Huh7
	Sorafenib	3.871 ± 1.74	2.930 ± 0.65
4b	H	>50	>50
4c	<i>o</i> -F	16.620 ± 6.345	42.312 ± 9.905
4d	<i>m</i> -F	>50	31.00 ± 4.219
4e	<i>p</i> -F	>50	>50
15a*	<i>o</i> -Cl	>50	1.011 ± 0.141
15b*	<i>m</i> -Cl	37.237 ± 6.123	4.800 ± 1.676
4f	<i>p</i> -Cl	>50	>50
15c*	<i>o</i> -CH ₃	>50	2.437 ± 0.518
15d*	<i>m</i> -CH ₃	24.152 ± 0.829	5.813 ± 0.863
4g	<i>p</i> -CH ₃	>50	>50
4h	<i>o</i> -CF ₃	>50	>50
4i	<i>m</i> -CF ₃	>50	>50
4j	<i>p</i> -CF ₃	>50	>50
15e*	<i>o</i> -CN	3.191 ± 0.906	15.315 ± 0.550
15f*	<i>m</i> -CN	>50	>50
4k	<i>p</i> -CN	>50	>50
15g*	<i>o</i> -NO ₂	3.734 ± 1.364	1.632 ± 0.030
15h*	<i>m</i> -NO ₂	>50	>50
4l	<i>p</i> -NO ₂	>50	>50
4m	<i>o</i> -OH	>50	>50
4n	<i>m</i> -OH	>50	>50
4o	<i>p</i> -OH	>50	>50
15i*	<i>o</i> -NH ₂	26.063 ± 4.377	3.718 ± 1.268
15j*	<i>m</i> -NH ₂	3.588 ± 2.218	>50
4s	<i>p</i> -NH ₂	>50	>50
15k*	<i>o</i> -NHAc	9.138 ± 1.346	1.197 ± 0.132
4p	<i>m</i> -NHAc	>50	>50
4q	<i>p</i> -NHAc	19.198 ± 6.436	15.882 ± 0.829
14l*	<i>o</i> -CONH ₂	5.289 ± 1.724	4.636 ± 0.182
15m*	<i>m</i> -CONH ₂	7.087 ± 0.390	1.633 ± 0.158
4r	<i>p</i> -CONH ₂	29.285 ± 1.664	11.554 ± 0.898

*ผลการทดลองของนางสาวชนิกานต์ เอี่ยมสะอาด (15a-15m)^{41 41 41} เพื่อจะให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ชัดเจน

ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและฤทธิ์ทางชีวภาพ (SARs)

ผลการทดสอบความเป็นพิษชี้ให้เห็นว่าโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่ไม่มีหมู่แทนที่ (R=H; 4b) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับทั้ง 2 เซลล์ (IC₅₀ >50 μM) แต่เมื่อใส่หมู่แทนที่บางหมู่พบว่า มีฤทธิ์เพิ่มขึ้น โดยโมเลกุลครึ่งหนึ่งของทั้งหมดมีค่า IC₅₀ น้อยกว่า 50 μM นอกจากนี้ยังพบอีกว่า โมเลกุลส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Huh7 มากกว่า HepG2 ยกเว้นโมเลกุล 4c (R = o-F), 15e (R = o-CN) และ 15j (R = m-NH₂) ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 มากกว่า Huh7 และการแทนที่ (substitution) ที่ตำแหน่ง *ortho* จะมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ดีกว่าตำแหน่ง *meta* และ *para* ตามลำดับ สำหรับหมู่ (R) NH₂, CH₃, NHAc, F, Cl, CONH₂, CN, และ NO₂ ยกเว้น 15j (R = m-NH₂) ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเซลล์ที่ดีกับ HepG2 (IC₅₀ = 3.59 μM) มากกว่า Huh7 (IC₅₀ >50 μM)

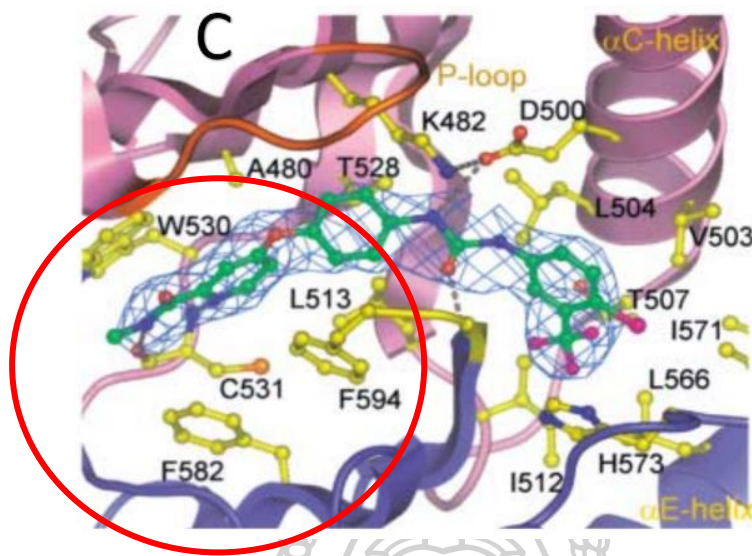
เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของโมเลกุลเลียนแบบกับความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (SARs) อย่างละเอียด พบว่าโมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่ไม่มีหมู่แทนที่ (R=H) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับทั้ง 2 เซลล์ (IC₅₀ >50 μM) แต่เมื่อเปลี่ยนหมู่แทนที่จากไฮโดรเจน (H) เป็นฟลูออรีน (F) ที่มีขนาดอะตอมใกล้เคียงกัน (รัศมีวานเดอร์วาลส์ของ H และ F เท่ากับ 1.2 และ 1.35 Å ตามลำดับ⁴²) พบว่าเมื่อมีหมู่แทนที่เป็นฟลูออรีนทำให้ความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเพิ่มขึ้น ซึ่งการแทนที่ของหมู่ดังกล่าวจะทำให้โมเลกุล 4c (R = o-F) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าโมเลกุล 4d (R = m-F) และโมเลกุล 4e (R = p-F) ตามลำดับ เมื่อเปลี่ยนจากฟลูออรีน (F) เป็นคลอรีน (Cl) ที่เป็นหมู่ฮาโลเจน (halogen) เหมือนกันแต่คลอรีนมีขนาดที่ใหญ่กว่า พบว่าคลอรีนมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง Huh7 สูงกว่าฟลูออรีนถึง 40 และ 6 เท่า ที่ตำแหน่ง *ortho* และ *meta* ตามลำดับ โดย 15a (R = o-Cl) และ 15b (R = m-Cl) มีค่า IC₅₀ สำหรับเซลล์มะเร็ง Huh7 มีเท่ากับ 1.011 μM และ 4.800 μM ตามลำดับ โดยที่โมเลกุล 15a มีค่า IC₅₀ ดีกว่าซอราเฟนิบ 2.9 เท่า สำหรับเซลล์มะเร็ง Huh7 แต่อย่างไรก็ตามในกรณีของการยับยั้ง HepG2 โมเลกุล 4c (R = o-F) กลับมีฤทธิ์ที่ดีกว่าโมเลกุล 15a (R = o-Cl) และเมื่อเปรียบเทียบการแทนที่บนวงเบนซีนด้วยหมู่เมทิล (methyl; CH₃) พบว่าการแทนที่ของหมู่เมทิลของโมเลกุล 15c (R = o-CH₃) ดีกว่า 15d (R = m-CH₃) และ 4g (R = p-CH₃) ตามลำดับสำหรับเซลล์ Huh7 สำหรับเซลล์ HepG2 พบว่ามีเพียงโมเลกุล 15d (R = m-CH₃) เท่านั้นที่มีฤทธิ์ ในขณะที่หมู่ไตรฟลูออโร

เมทิลที่มีขนาดใกล้เคียงกับหมู่เมทิล พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับทั้ง 2 เซลล์ ($IC_{50} > 50 \mu M$)

สำหรับหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่ดึงอิเล็กตรอน (CF_3 , CN , NO_2) พบว่าสำหรับหมู่แทนที่ NO_2 ของโมเลกุล **15g** ($R = o-NO_2$) มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าซอราเฟนิบประมาณ 1.8 เท่าสำหรับเซลล์ Huh7 และมีฤทธิ์ยับยั้ง HepG2 ใกล้เคียงกับยามาตราฐาน, หมู่แทนที่ CN ของโมเลกุล **15e** ($R = o-CN$) มีศักยภาพในการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าซอราเฟนิบประมาณ 1.2 เท่าสำหรับเซลล์ HepG2 และหมู่ CF_3 เป็นหมู่แทนที่ที่ไม่เหมาะสม เพราะทำให้โมเลกุลเลียนแบบ **4h** ($R = o-CF_3$), **4i** ($R = m-CF_3$), **4j** ($R = p-CF_3$) ไม่มีฤทธิ์ สำหรับหมู่แทนที่ OH , NH_2 และ $NHAc$ นอกจากจะเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอนแล้วยังเป็น H-bond donor และ H-bond acceptor ได้อีกด้วย (OH , NH_2 , $NHAc$) พบว่าสารที่มีหมู่แทนที่เป็นไฮดรอกซิล (OH) มีค่า $IC_{50} > 50 \mu M$ แสดงว่าหมู่ไฮดรอกซิลนี้เป็นหมู่ไม่เหมาะสม, หมู่แทนที่ NH_2 ของโมเลกุล **15i** ($R = o-NH_2$) มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ Huh7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.718 \mu M$ ในทางตรงกันข้ามถ้าหมู่ NH_2 ของโมเลกุล **15j** ($R = m-NH_2$) จะมีความจำเพาะต่อเซลล์ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.588 \mu M$ ซึ่งใกล้เคียงกับการยับยั้งของซอราเฟนิบ ($3.871 \mu M$) และเมื่อแทนที่ para ของโมเลกุล **4s** ($R = p-NH_2$) จะมีฤทธิ์ที่แย่ แต่เมื่อเติมหมู่อะซิติก (acetyl) เพื่อลด H-bond donor แต่เพิ่ม H-bond acceptor แก่หมู่อะมิโนทั้ง 3 ตำแหน่ง [**15k** ($R = o-NHAc$), **4p** ($R = m-NHAc$), **4q** ($R = p-NHAc$)] พบว่าโมเลกุลดังกล่าวมีฤทธิ์ทั้ง HepG2 และ Huh7 ยกเว้นโมเลกุลเลียนแบบ **4p** ($R = m-NHAc$) ที่มีค่า $IC_{50} > 50 \mu M$ ทั้ง 2 เซลล์มะเร็ง โดยที่โมเลกุลเลียนแบบ **15k** ($R = o-NHAc$) สามารถพัฒนาฤทธิ์ได้เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า สำหรับทั้ง 2 เซลล์และมีค่า IC_{50} ($1.197 \mu M$) ดีกว่าซอราเฟนิบ 2.5 เท่าสำหรับเซลล์ Huh7 และ **4q** ($R = p-NHAc$) มีฤทธิ์ปานกลางทั้งสองเซลล์มะเร็งระดับ เมื่อผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าหมู่อะซิติกสามารถพัฒนาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งได้ ผู้วิจัยจึงได้สังเคราะห์หมู่แทนที่ที่สามารถเป็นได้ทั้ง H-bond donor และ H-bond acceptor ใกล้เคียงกับหมู่เอ็น-อะซิติก (*N*-Acetyl; $NHAc$) คือหมู่คาร์บอกซาไมด์ (carboxamide; $CONH_2$) พบว่าโมเลกุล **15l** ($R = o-CONH_2$), **15m** ($R = m-CONH_2$) และ **4r** ($R = p-CONH_2$) มีฤทธิ์ดีถึงดีมาก ทั้ง 2 เซลล์เหมือนกับโมเลกุลเลียนแบบที่มีหมู่แทนที่ที่เป็นหมู่เอ็น-อะซิติก โดยโมเลกุล **15m** ($R = m-CONH_2$) มีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.633 \mu M$ ดีกว่าซอราเฟนิบ 1.8 เท่าสำหรับเซลล์ Huh7 สุดท้ายเมื่อพิจารณาความเป็นหมู่ให้อิเล็กตรอน (OH , NH_2 , $NHAc$) และหมู่ดึงอิเล็กตรอน (CF_3 , CN , NO_2) ของหมู่แทนที่ (R) พบว่าความเป็นหมู่ให้/ดึงอิเล็กตรอนไม่ส่งผลต่อฤทธิ์อย่างมีนัยยะสำคัญ โดยที่หมู่ OH และ CF_3 เป็นหมู่ที่ไม่เหมาะสม เพราะเมื่อมีหมู่แทนที่ดังกล่าวทำให้โมเลกุลเลียนแบบไม่มีฤทธิ์ทั้ง 2 เซลล์มะเร็ง

โมเลกุล **15a** ($R = o\text{-Cl}$) และ **15c** ($R = o\text{-CH}_3$) มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์ Huh7 มากที่สุด โดยสารทั้งสองมีค่า IC_{50} มากกว่า $50 \mu\text{M}$ สำหรับเซลล์ HepG2 และมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.011 \mu\text{M}$ และ $2.437 \mu\text{M}$ ซึ่งดีกว่ายาซอราเฟนิบ 2.9 และ 1.20 เท่าตามลำดับ สำหรับเซลล์ Huh7, โมเลกุลเลียนแบบ **15j** ($R = m\text{-NH}_2$) มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์ HepG2 มากที่สุด ซึ่งดีกว่าซอราเฟนิบ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.588 \mu\text{M}$ และ $>50 \mu\text{M}$ สำหรับเซลล์ HepG2 และ Huh7 ตามลำดับ สำหรับโมเลกุลในกลุ่มนี้พบว่าโมเลกุล **15e** ($R = o\text{-CN}$) และ **15j** ($R = m\text{-NH}_2$) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.191 \mu\text{M}$ และ $3.588 \mu\text{M}$ ซึ่งดีกว่าซอราเฟนิบ 1.21 และ 1.08 เท่าตามลำดับ สำหรับเซลล์ HepG2, โมเลกุลเลียนแบบ **15a** ($R = o\text{-Cl}$), **15c** ($R = o\text{-CH}_3$), **15g** ($R = o\text{-NO}_2$), **15k** ($R = o\text{-NHAc}$) และ **15m** ($R = m\text{-CONH}_2$) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ Huh7 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.011 \mu\text{M}$, $2.437 \mu\text{M}$, $1.632 \mu\text{M}$, $1.197 \mu\text{M}$ และ $1.633 \mu\text{M}$ ซึ่งดีกว่าซอราเฟนิบ 2.9, 1.20, 1.80, 2.45 และ 1.79 เท่าตามลำดับ สำหรับเซลล์ Huh7 นอกจากนี้โมเลกุล **15g** ($R = o\text{-NO}_2$) มีศักยภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับที่ดีกับเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.588 \mu\text{M}$ และ $1.632 \mu\text{M}$ สำหรับเซลล์ HepG2 และ Huh7 ตามลำดับ ซึ่งมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับซอราเฟนิบสำหรับเซลล์ hepG2 และมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ที่ดีกว่าซอราเฟนิบ 1.8 เท่าสำหรับเซลล์ Huh7

สำหรับการพัฒนาโมเลกุลเลียนแบบของสารกลุ่มนี้ในอนาคต ผู้วิจัยคาดว่าจะลองเพิ่มระยะห่างระหว่างวง 1,2,3-ไตรเอโซลกับวงเบนซีนให้มากขึ้น ทำให้วงเบนซีนมีความอิสระเพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มโอกาสให้วงเบนซีนเกิดอันตรกิริยากับบริเวณเร่งของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งได้มากขึ้น เช่น สำหรับเอนไซม์ B-raf การเพิ่มระยะห่างดังกล่าวอาจจะทำให้วงเบนซีนเกิดอันตรกิริยากับบริเวณเร่งของเอนไซม์แบบไพ-ไพ ($\pi\text{-}\pi$ interaction) ได้แข็งแรงขึ้นดังรูปภาพที่ 25 จนสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้อาจจะสังเคราะห์โมเลกุลเลียนแบบโดยทำการแปรเปลี่ยนที่วงฟีนอกซี เช่น เปลี่ยนเป็น 1,3-disubstituted ที่สามารถเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างมาก⁸ หรืออาจจะเพิ่มหมู่ฟลูออโรเข้าไปให้คล้ายกับยาเรโกราเฟนิบ²¹



รูปภาพที่ 25 X-ray crystallography ระหว่างเอนไซม์ BRAF และซอร์afenิบ (C)³¹



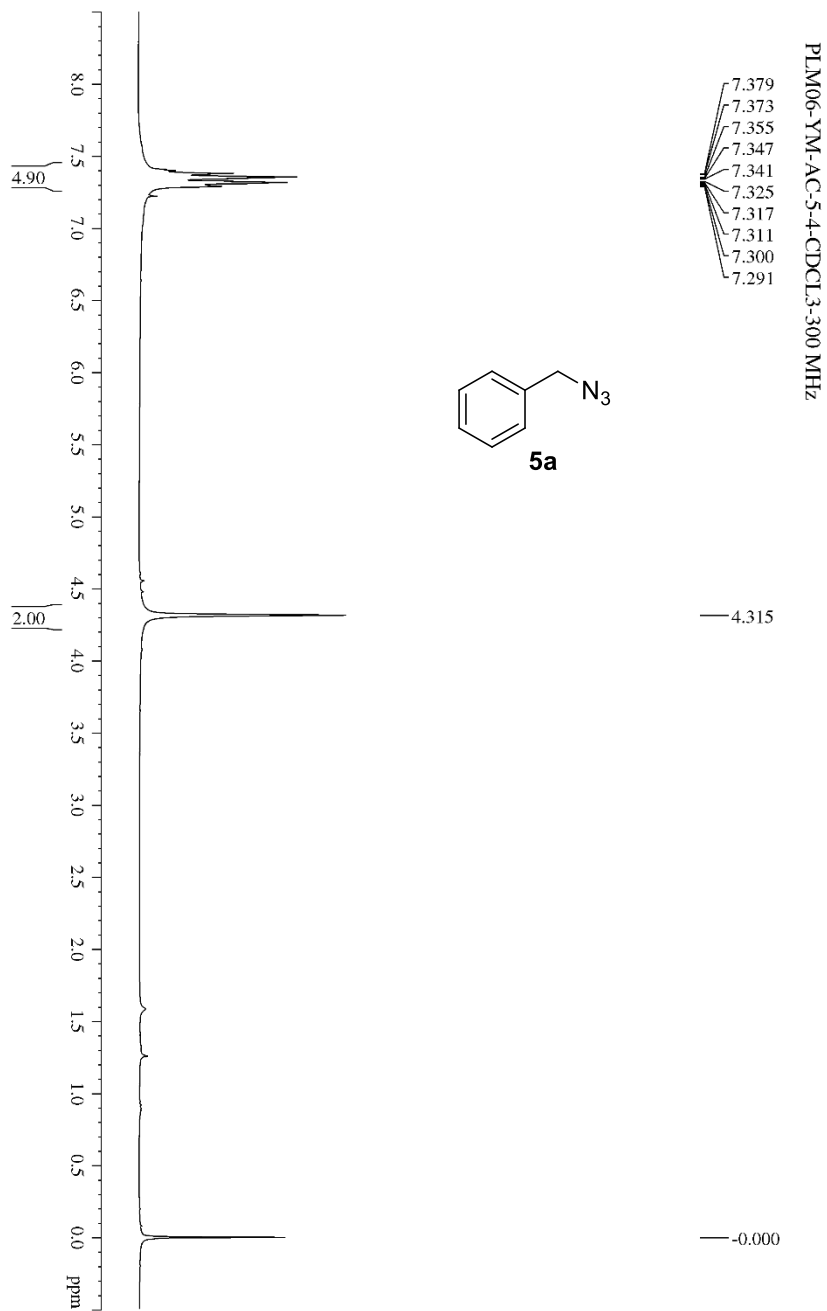
บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

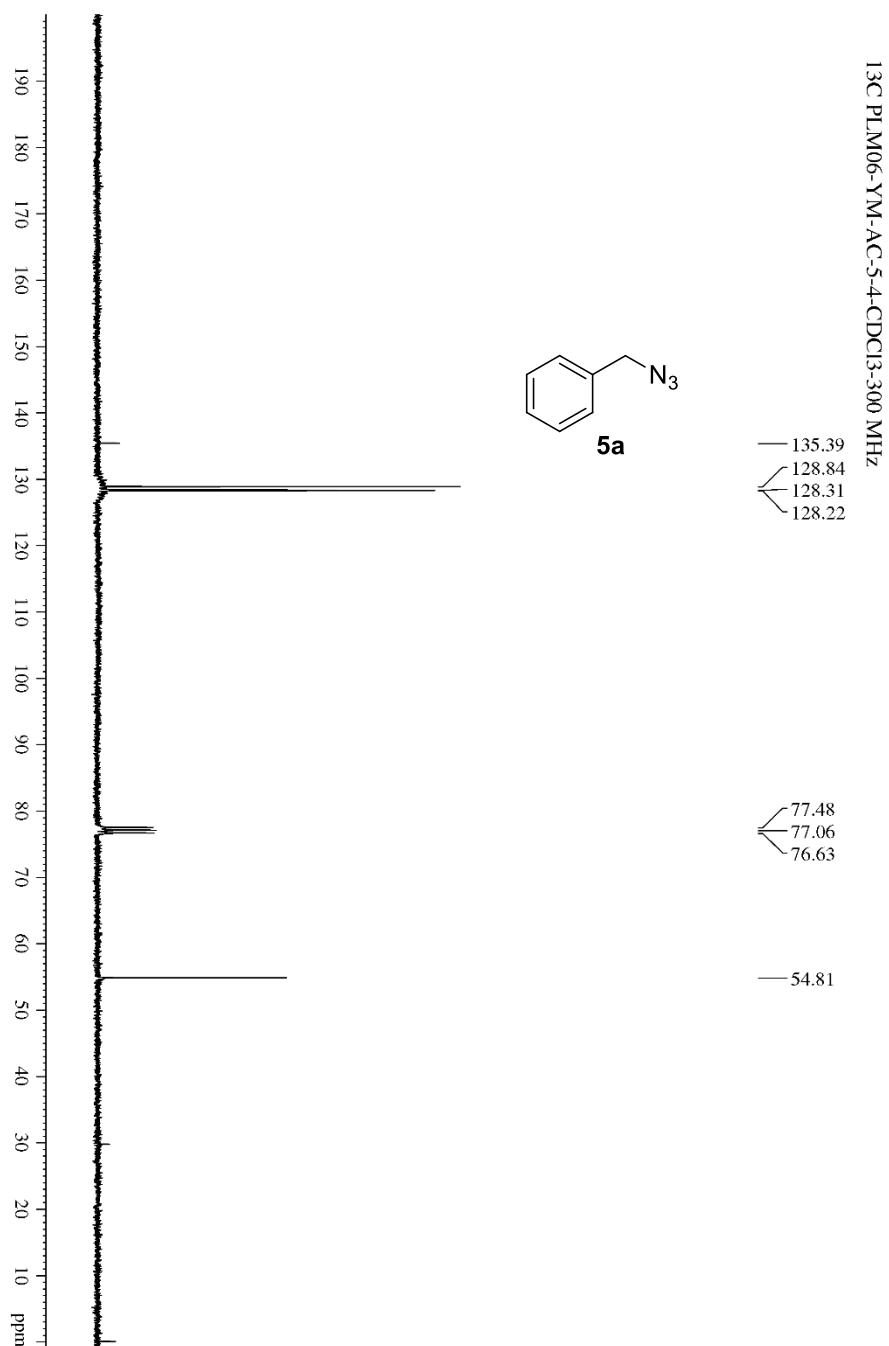
โมเลกุลเลียนแบบซอราเฟนิบที่พิกโคลิโนไมด์ของซอราเฟนิบถูกแทนที่ด้วยหมู่ 1,2,3-ไตรเอโซล ทั้ง 16 โมเลกุล สามารถสังเคราะห์ได้สำเร็จด้วยปฏิกิริยาหลัก ได้แก่ การแทนที่แบบนิวคลีโอฟีลิกอะโรมาติก โพรพาซิลเลชัน และซุซเกน 1,3-ไดโพลาร์ไซโคลแอดดิชัน โดยมีผลผลิตรวมร้อยละดีถึงดีมาก และนำสารผลิตภัณฑ์ดัดแปลงด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วย H_2O_2 และรีดักชันด้วย Sn/HCl ได้ผลิตภัณฑ์อีก 2 โมเลกุล โดยผลผลิตร้อยละที่ดีเยี่ยม จากนั้นนำโมเลกุลเป้าหมาย (target compound) ทั้ง 18 โมเลกุลไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 และ Huh7 ด้วยวิธี MTT assay และนำมาอภิปรายผลการทดลองร่วมกับผลการทดสอบฤทธิ์ของนางสาวชนิกานต์ เอี่ยมสอาด (15a-15m)⁴¹ พบว่าโมเลกุลส่วนใหญ่ที่มีฤทธิ์มีความเป็นพิษต่อเซลล์ Huh7 มากกว่า HepG2 และการแทนที่ของหมู่ที่ตำแหน่ง *ortho* มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งระดับทั้งสองได้ดีกว่าตำแหน่ง *meta* และ *para* ตามลำดับ

โมเลกุล **15e** (R = *o*-CN) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ HepG2 มากที่สุด ซึ่งดีกว่าซอราเฟนิบประมาณ 1.2 เท่า โมเลกุลเลียนแบบ **15a** (R = *o*-Cl) และ **15k** (R = *o*-NHAc) มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งระดับ Huh7 มากที่สุด ซึ่งดีกว่าซอราเฟนิบประมาณ 2.9 และ 2.5 เท่าตามลำดับ นอกจากนี้โมเลกุล **15g** (R = *o*-NO₂) มีศักยภาพในการยับยั้งที่ดีกับเซลล์มะเร็งระดับที่ดีทั้งสองชนิด โดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับซอราเฟนิบสำหรับเซลล์ HepG2 และดีกว่าซอราเฟนิบประมาณ 1.8 เท่าสำหรับเซลล์ Huh7

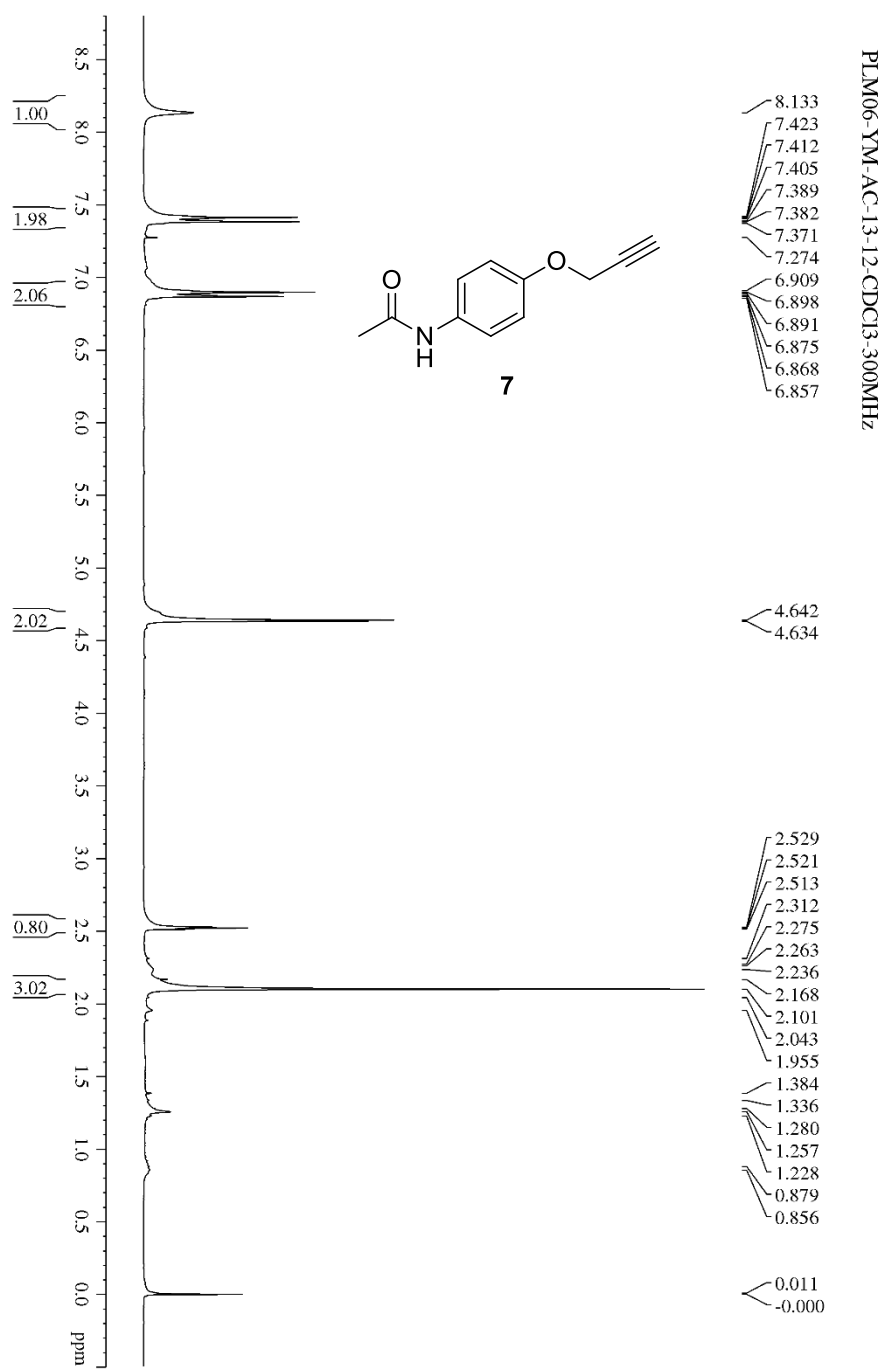




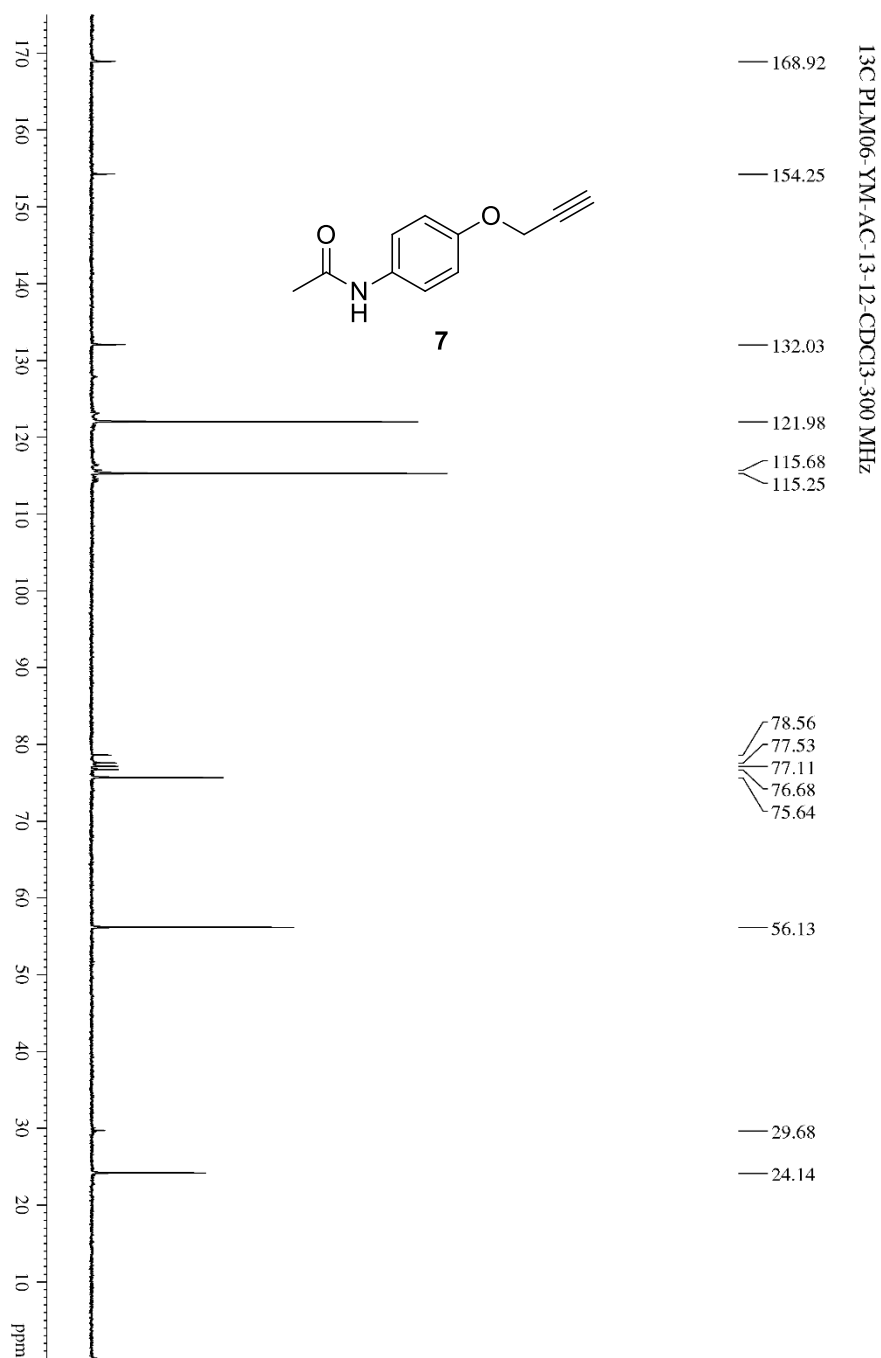
รูปภาพที่ 26 ¹H NMR สเปกตรัมของ benzyl azide (**5a**)



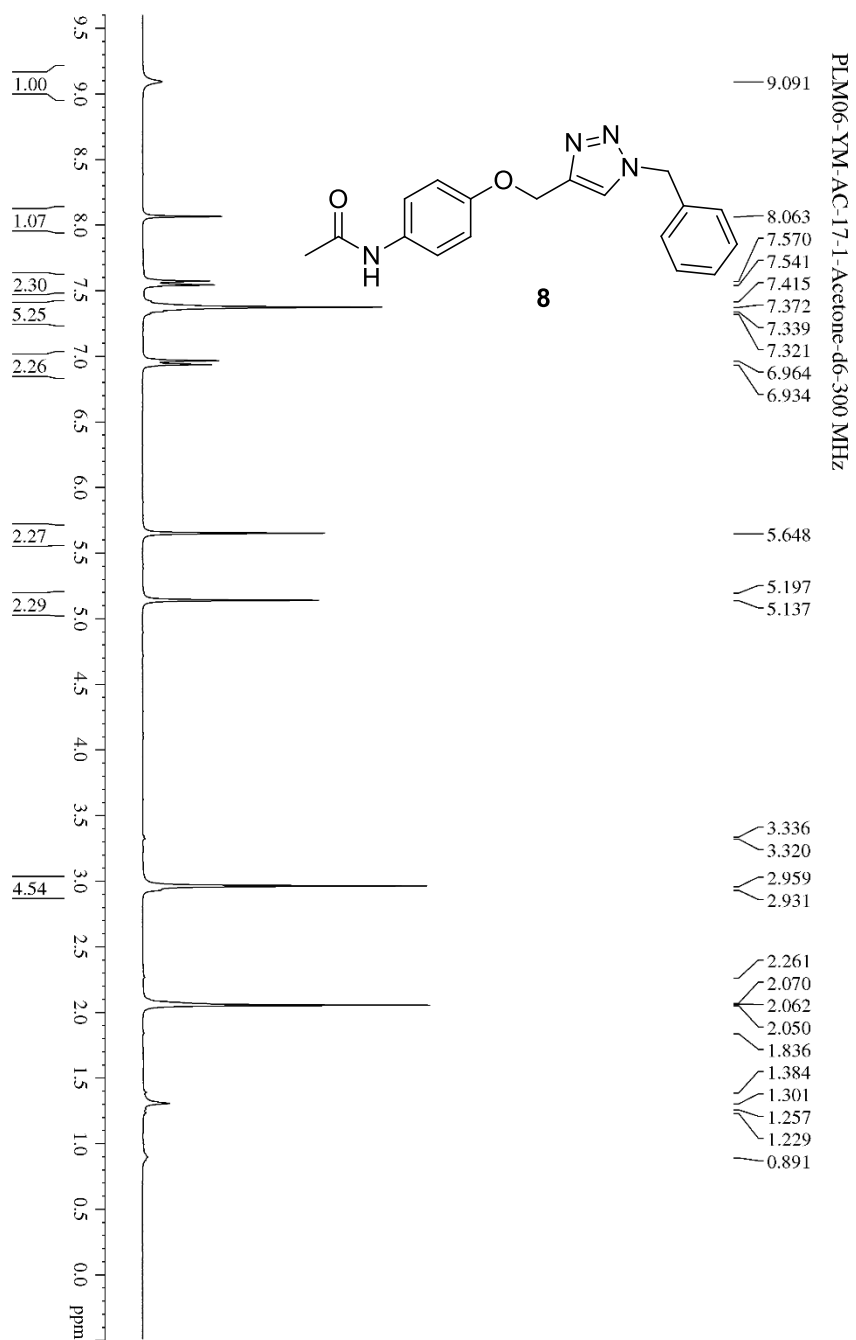
รูปภาพที่ 27 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ benzyl azide (**5a**)



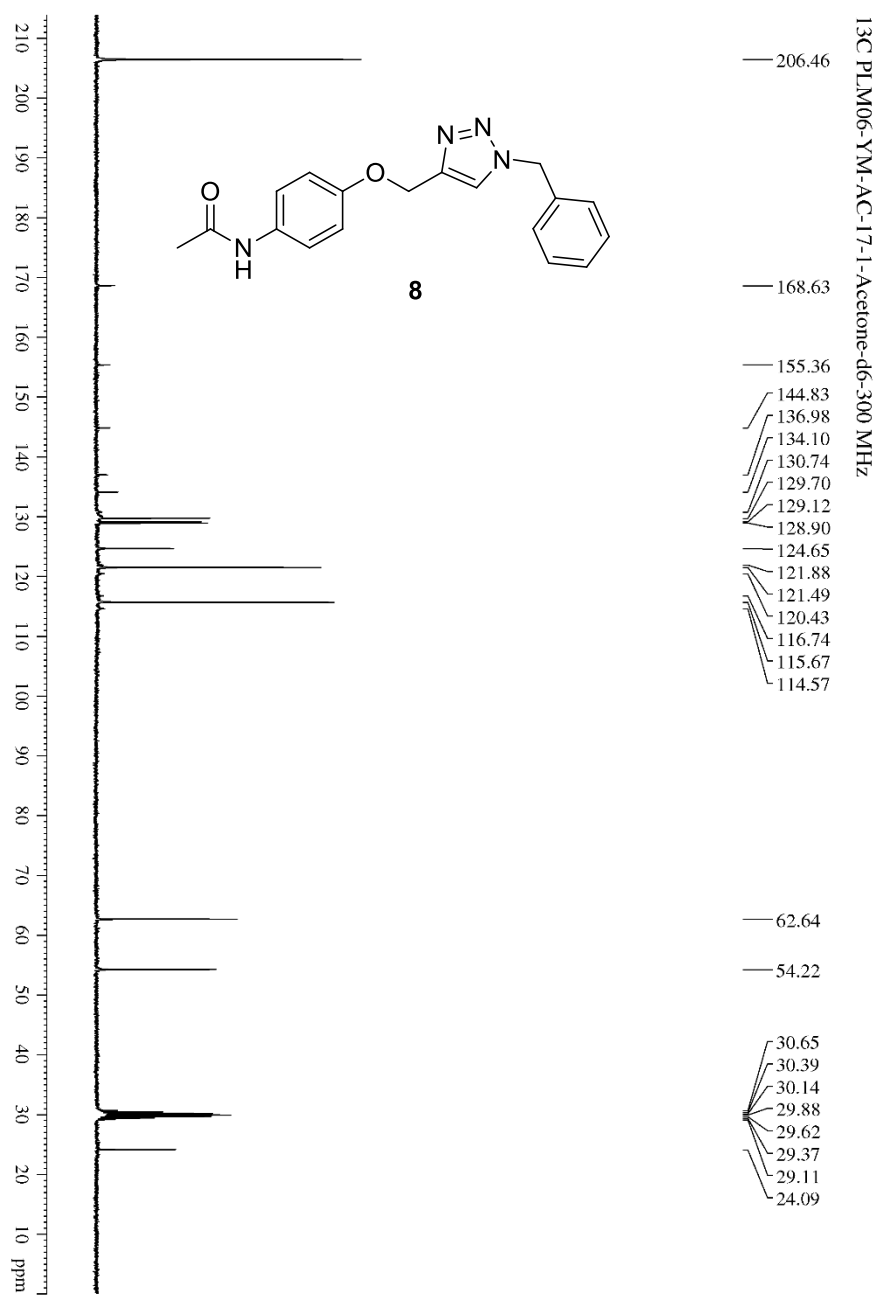
รูปภาพที่ 28 ¹H NMR สเปกตรัมของ *N*-acetyl-4-amino-1-propargyloxybenzene (7)



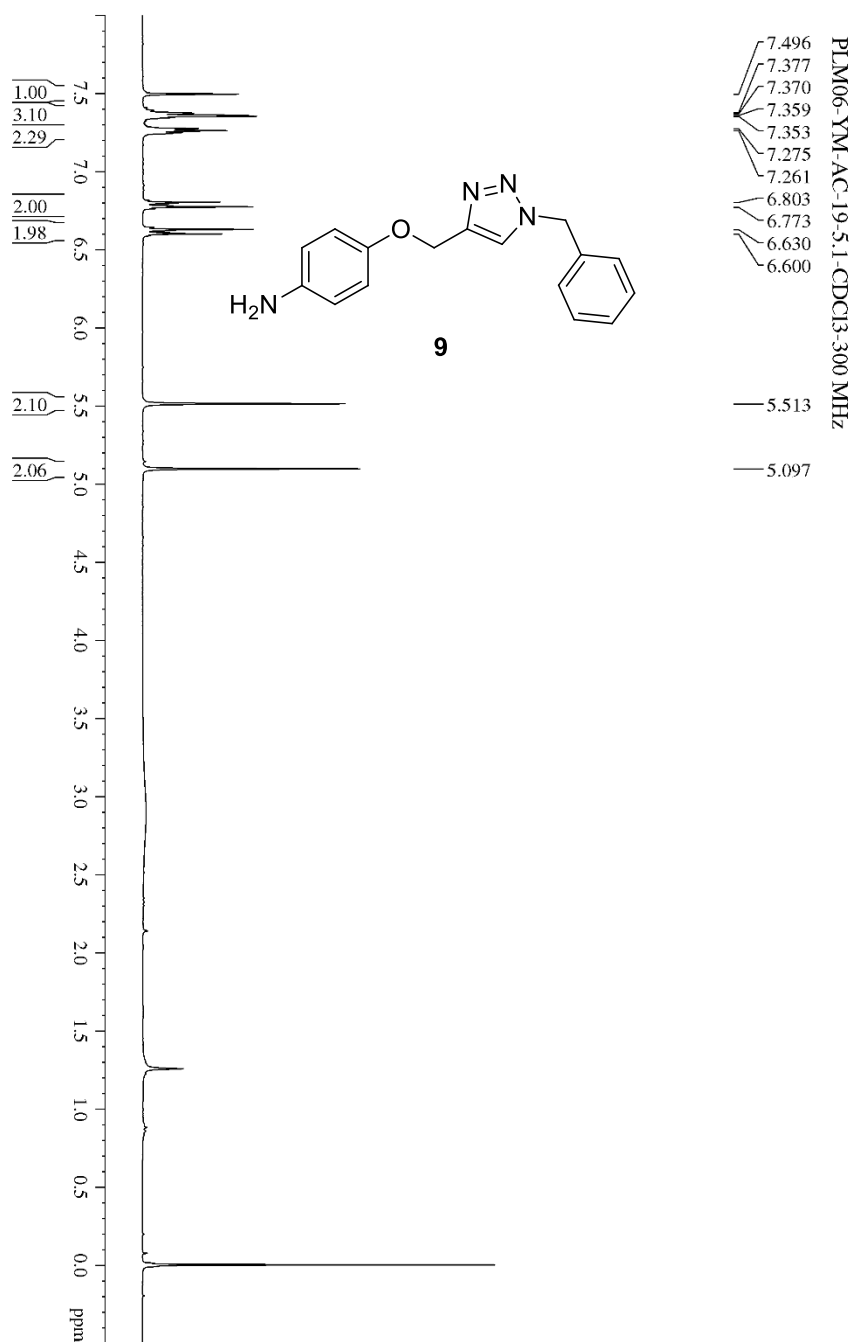
รูปภาพที่ 29 ¹³C NMR สเปกตรัมของ *N*-acetyl-4-amino-1-propargyloxybenzene (7)



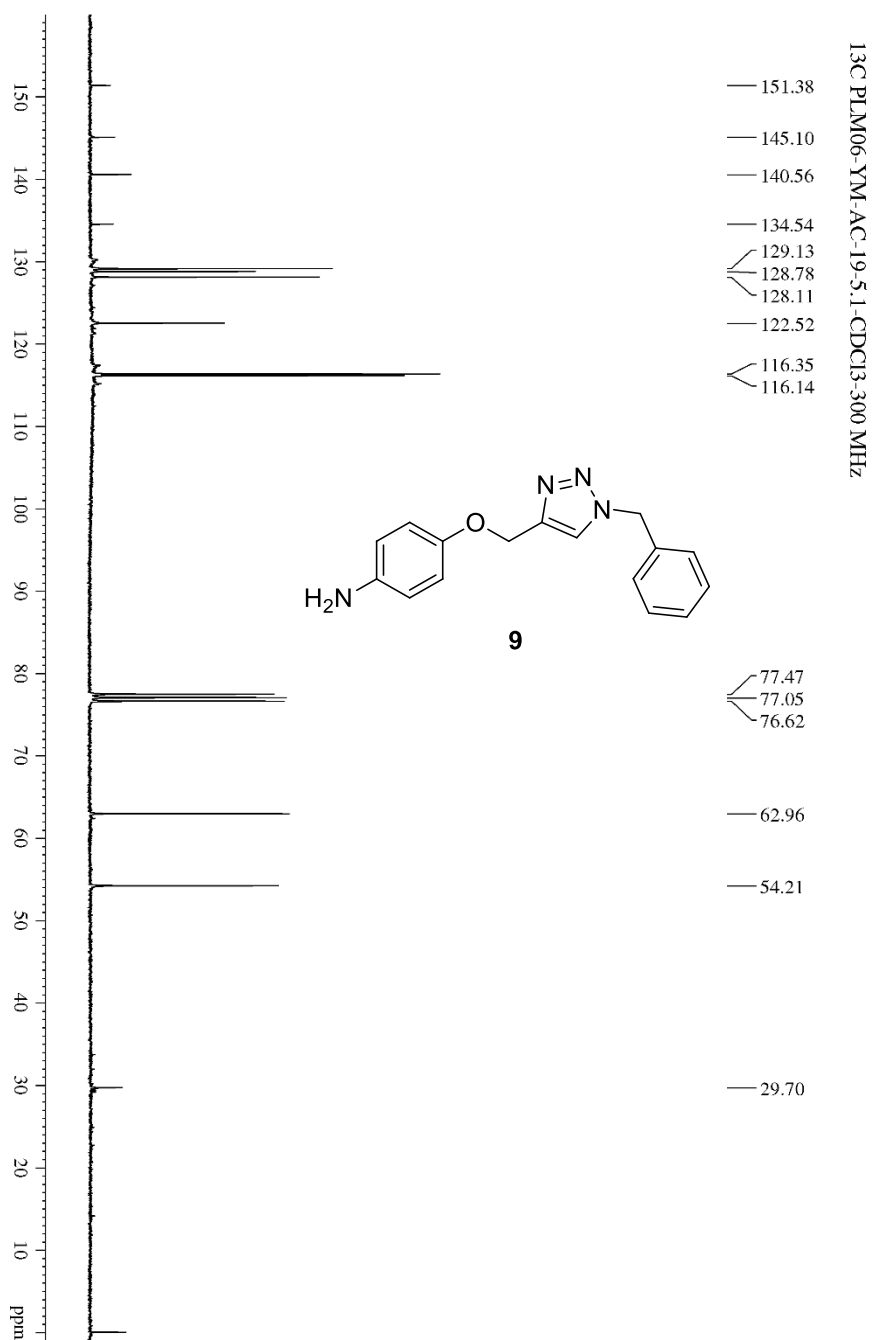
รูปภาพที่ 30 ^1H NMR สเปกตรัมของ *N*-(4-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)acetamide (**8**)



รูปภาพที่ 31 ¹³C NMR สเปกตรัมของ *N*-(4-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)phenyl)acetamide (**8**)



รูปภาพที่ 32 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)aniline (**9**)



รูปภาพที่ 33 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4-((1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)aniline (**9**)

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

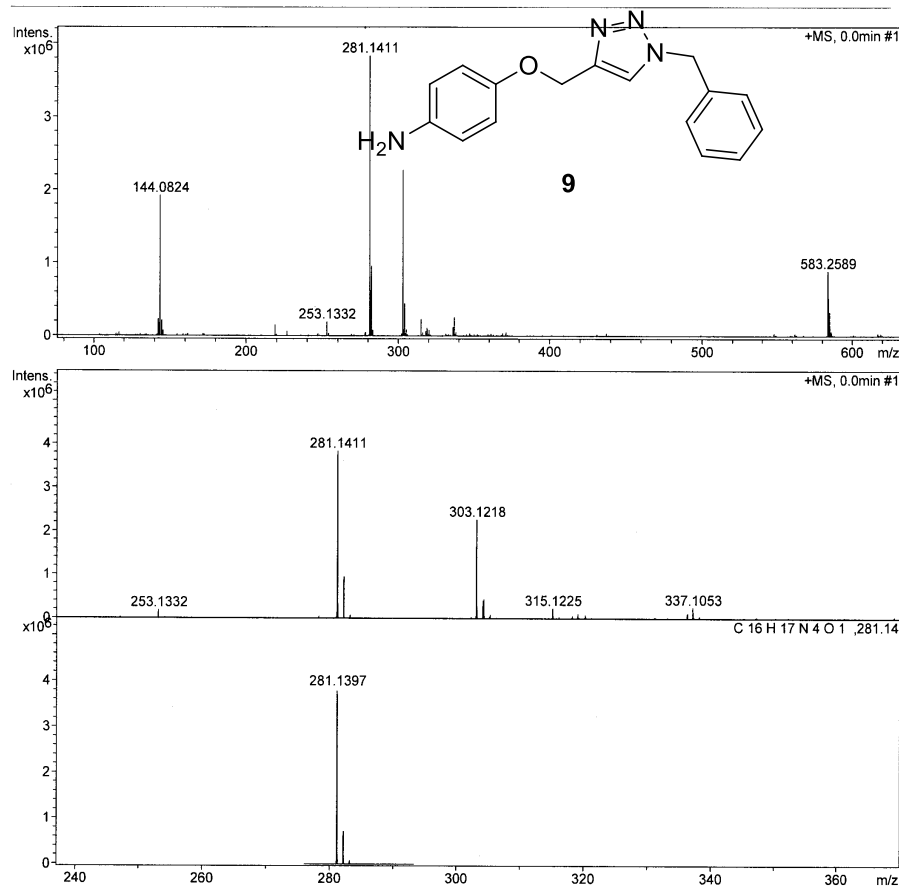
Analysis Name D:\Data\customer\1A.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name 1A

Acquisition Date 12/22/2016 1:18:07 PM

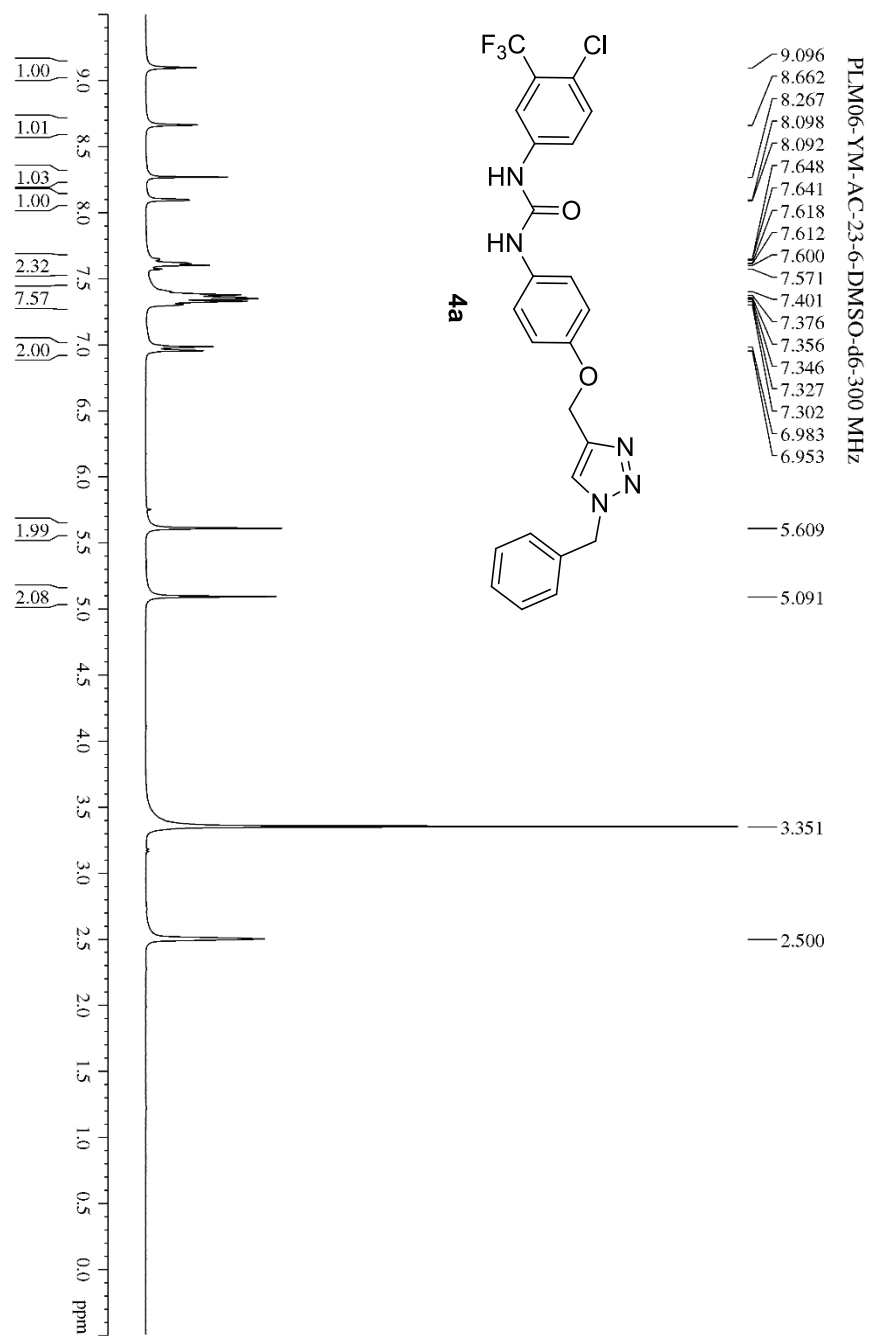
Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

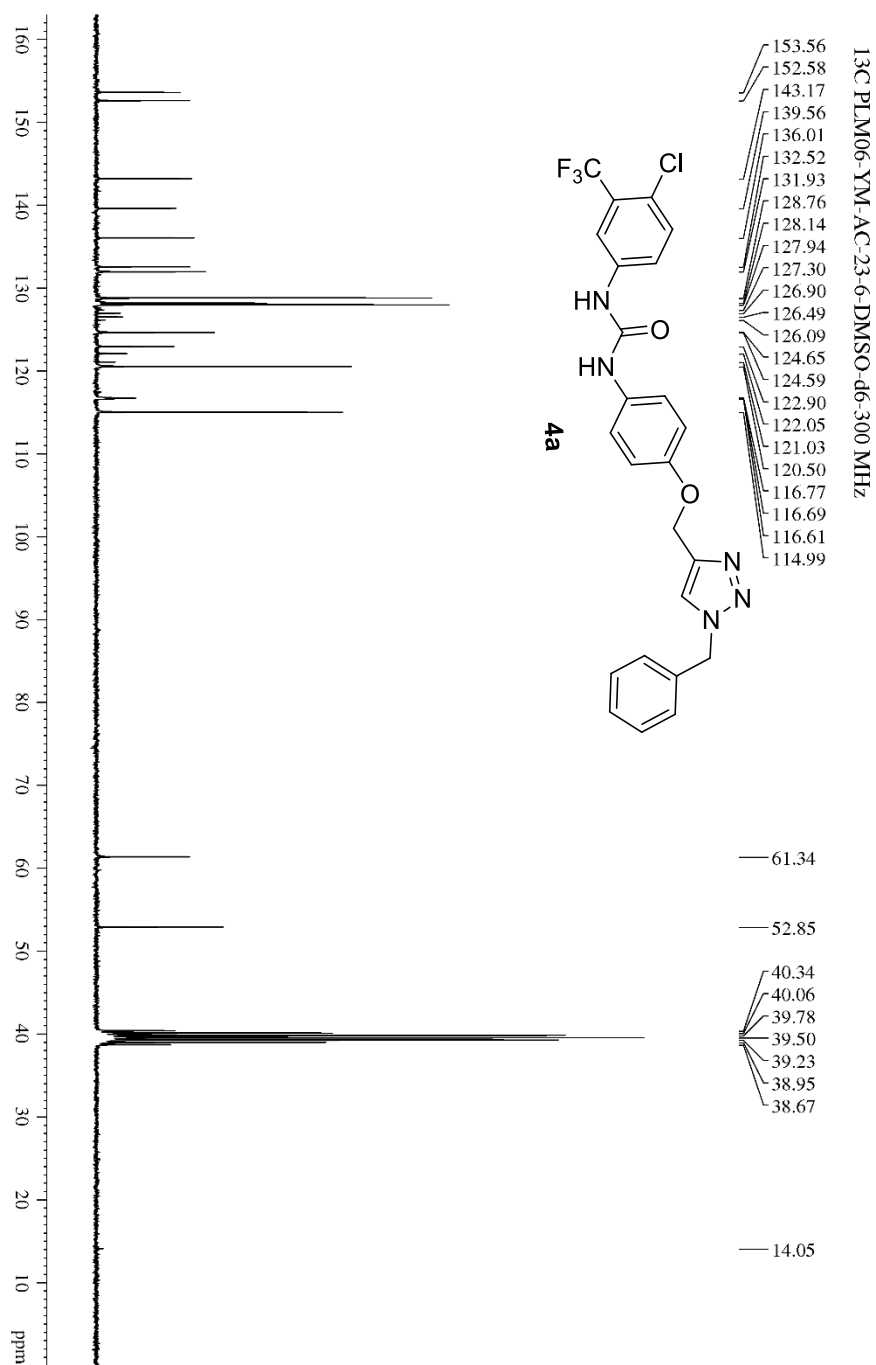
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



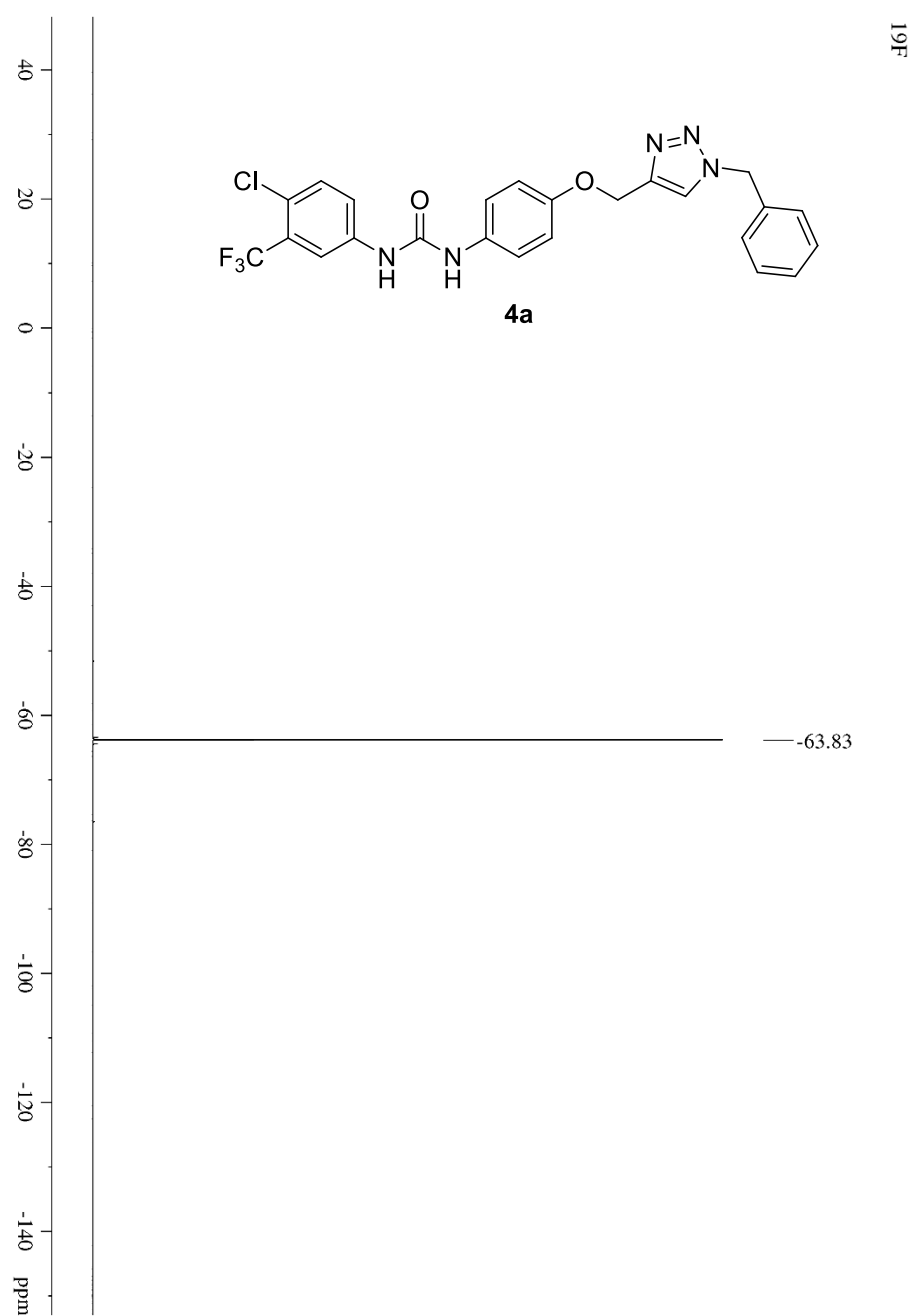
รูปภาพที่ 34 MS สเปกตรัมของ 4-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)aniline (9)



รูปภาพที่ 35 ^1H NMR สเปกตรัมของ **4a** ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย route 1



รูปภาพที่ 36 ¹³C NMR สเปกตรัมของ **4a** ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย route 1



รูปภาพที่ 37 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ **4a** ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย route 1

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

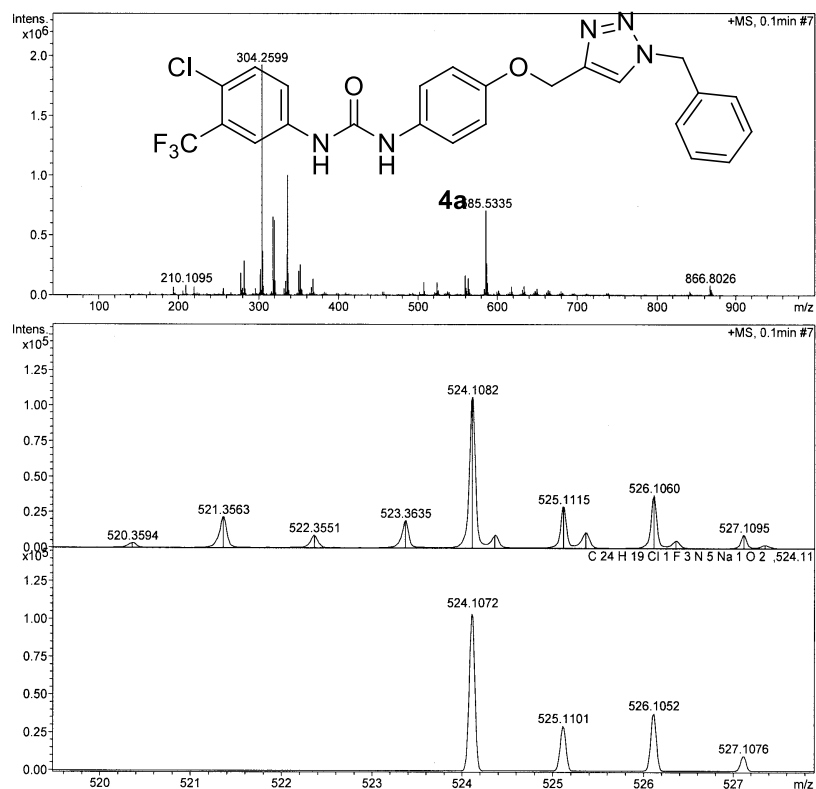
Analysis Name D:\Data\customer\3A.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name 3A

Acquisition Date 12/22/2016 1:50:48 PM

Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

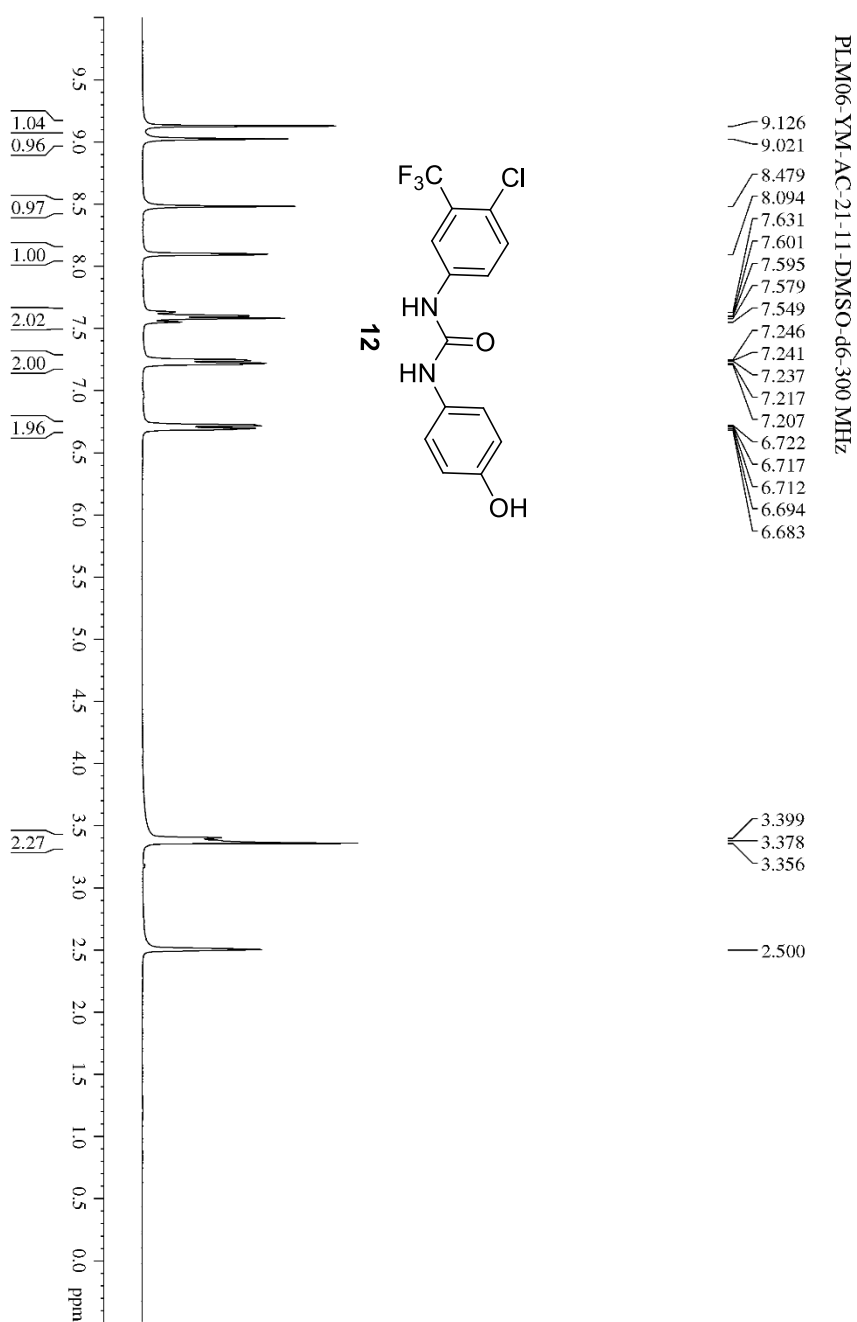


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

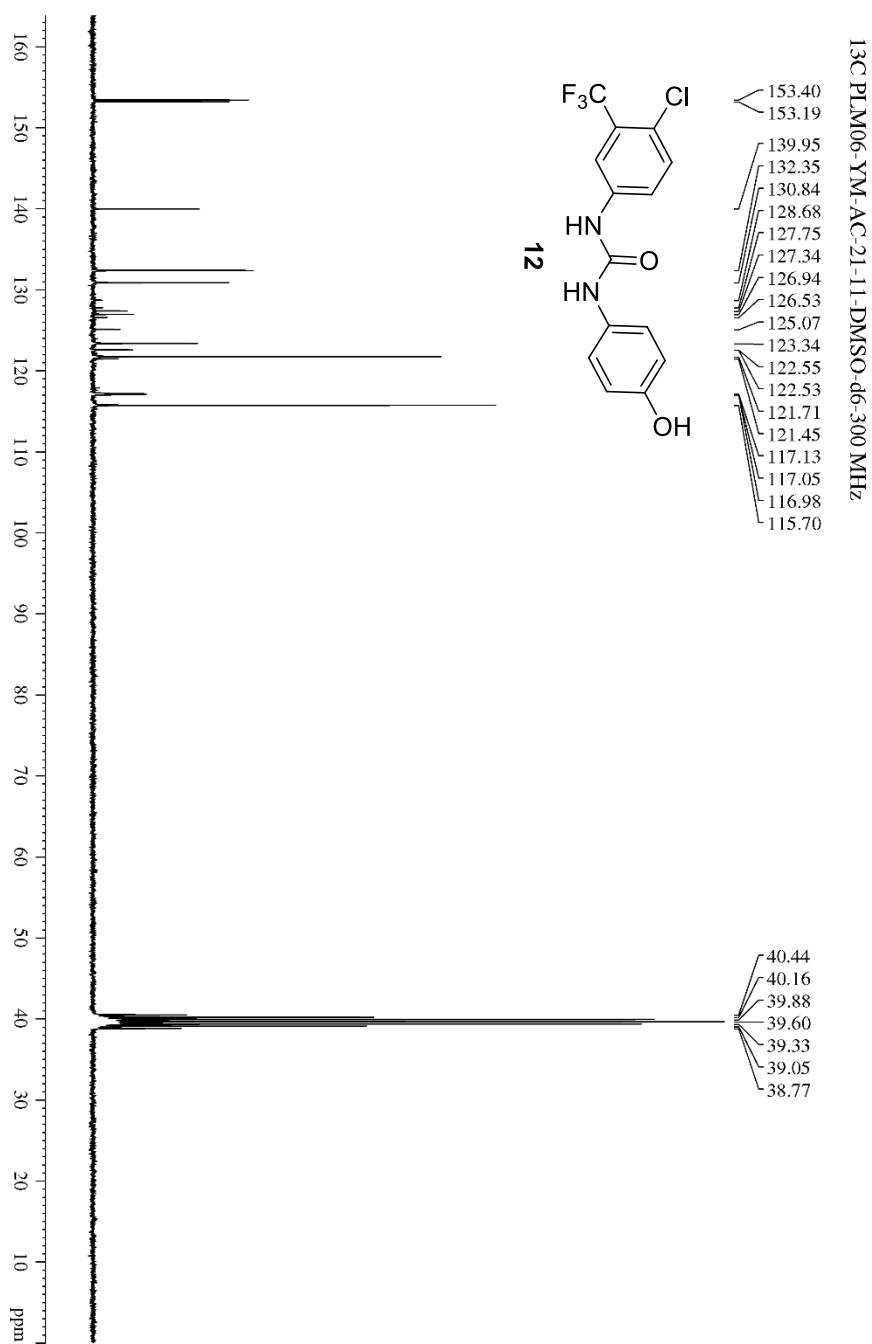
printed: 12/22/2016 5:16:43 PM

Page 1 of 1

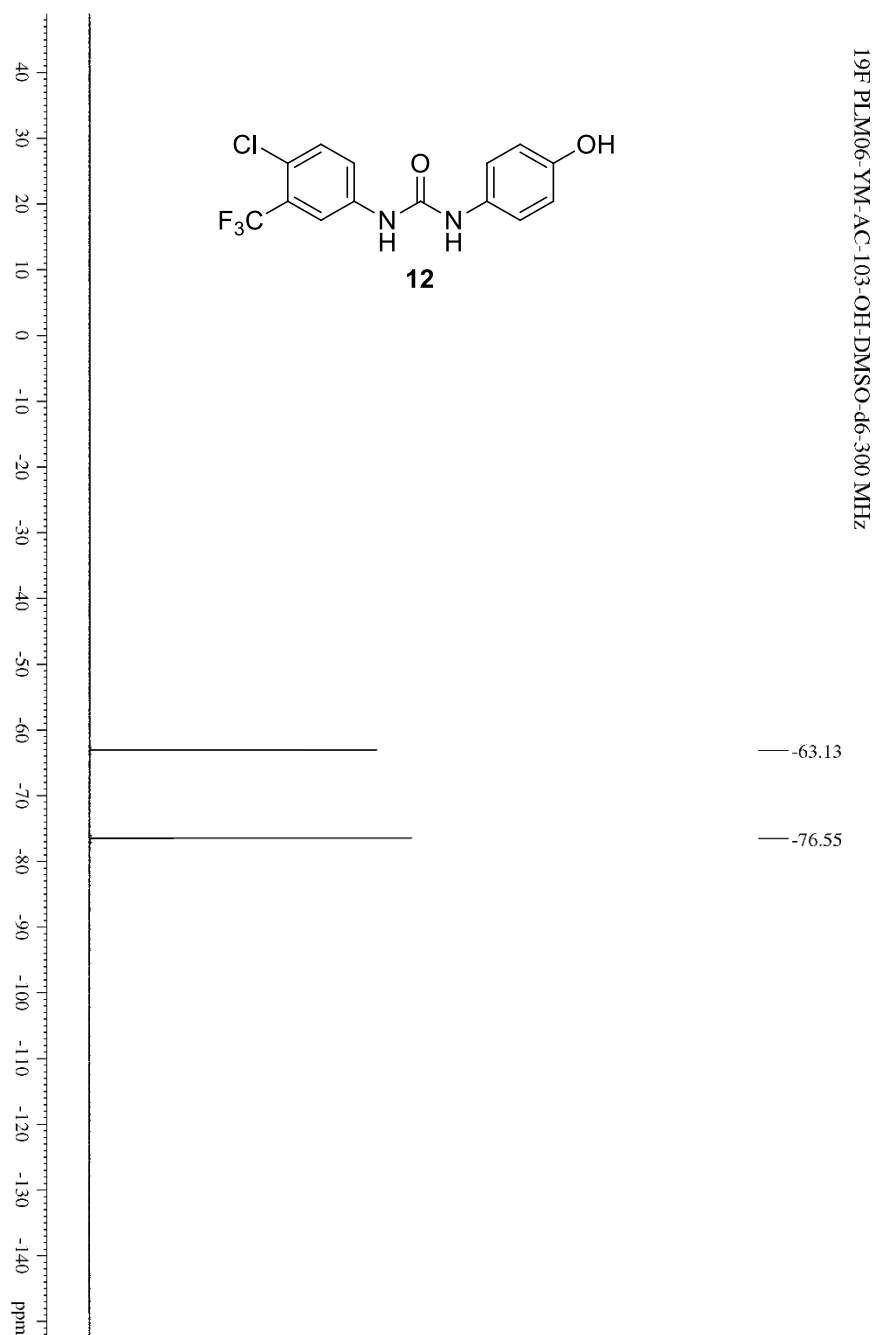
รูปภาพที่ 38 MS สเปกตรัมของ 4a ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย route 1



รูปภาพที่ 39 ¹H NMR สเปกตรัมของ 12

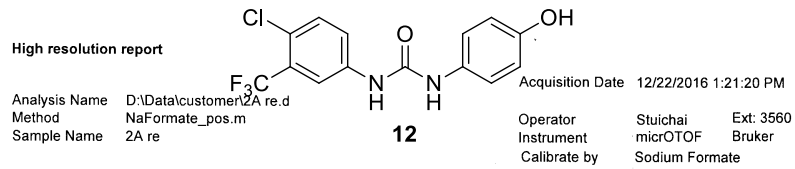


รูปภาพที่ 40 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 12

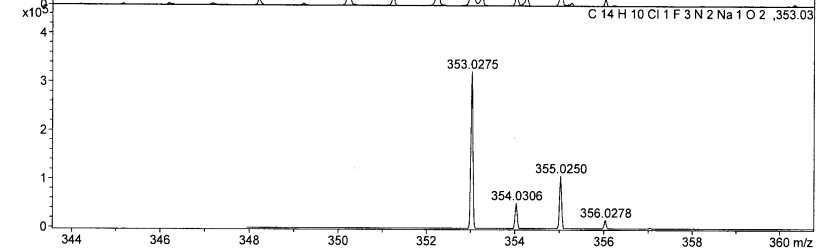
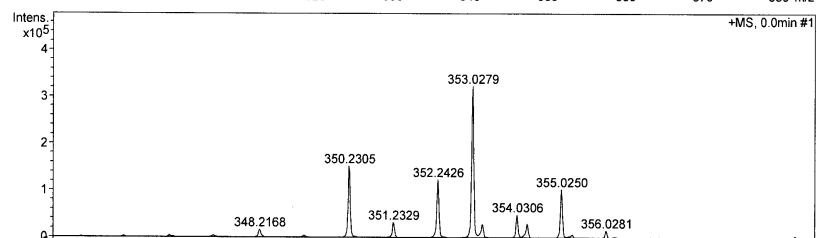
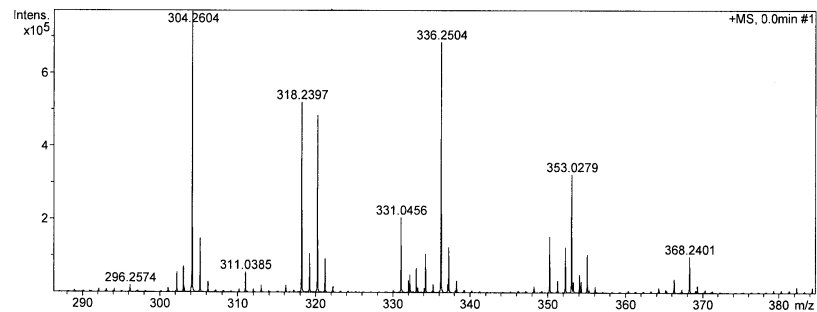


รูปภาพที่ 41 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 12

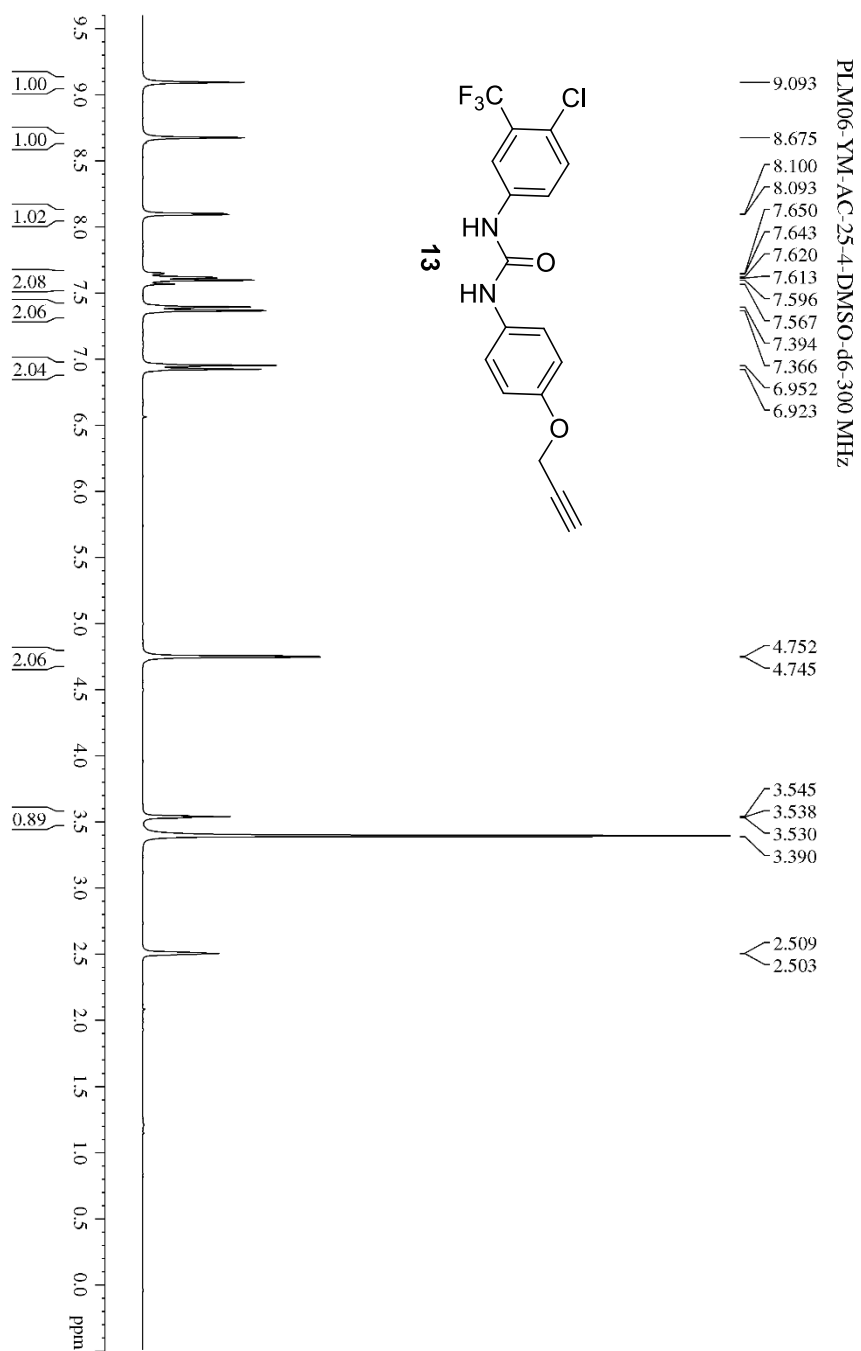
BIORESOURCES RESEARCH UNIT



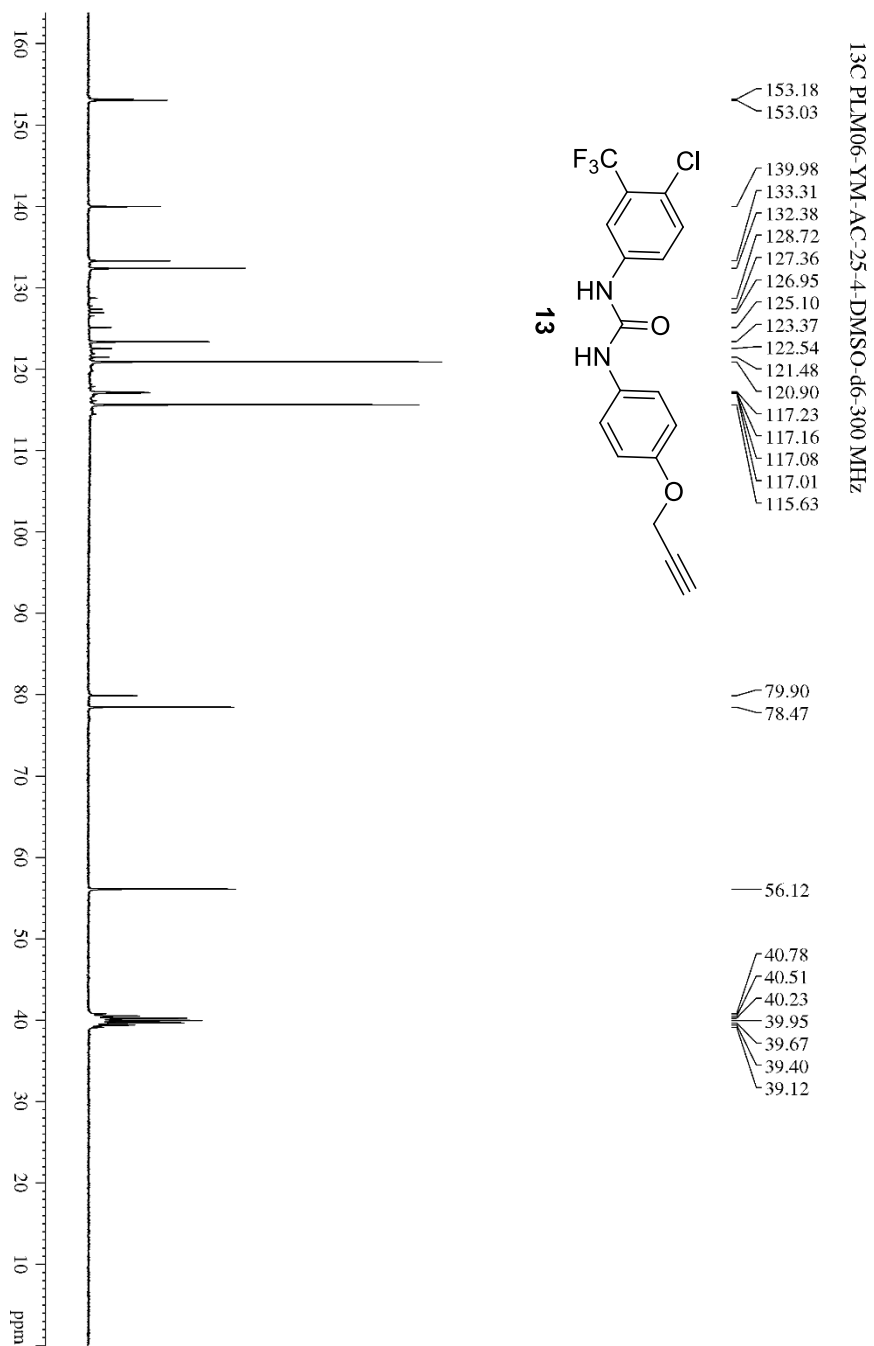
Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



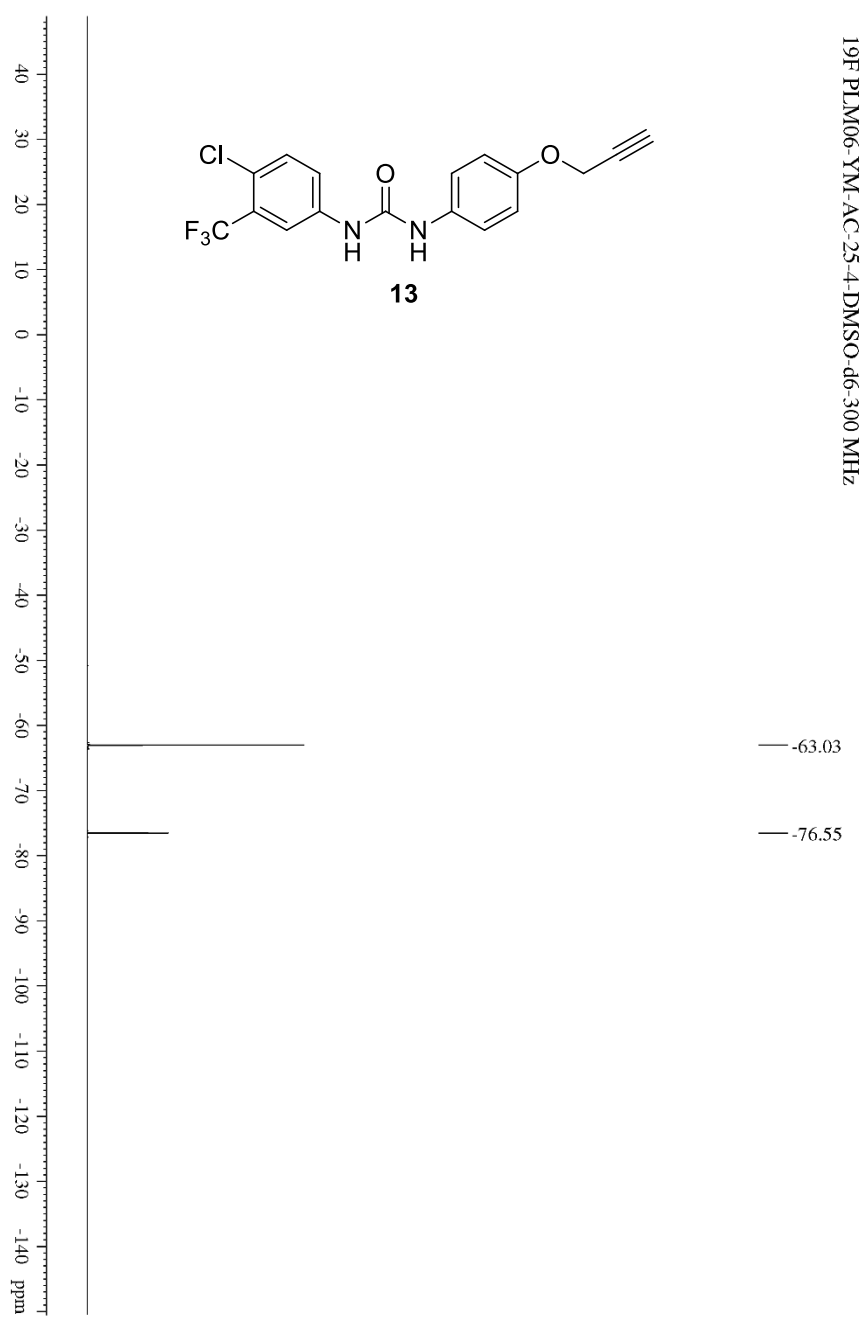
รูปภาพที่ 42 MS สเปกตรัมของ 12



รูปภาพที่ 43 ^1H NMR สเปกตรัมของ 13



รูปภาพที่ 44 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 13



รูปภาพที่ 45 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 13

BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

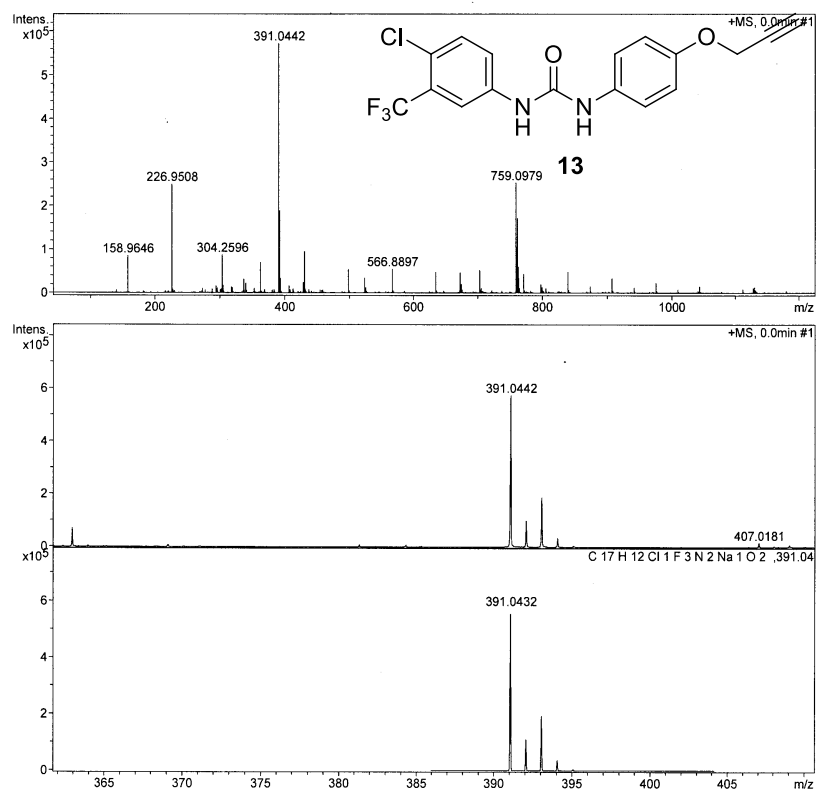
Analysis Name D:\Data\customer\2B.d
Method NaFormate_pos.m
Sample Name 2B

Acquisition Date 12/22/2016 3:44:06 PM

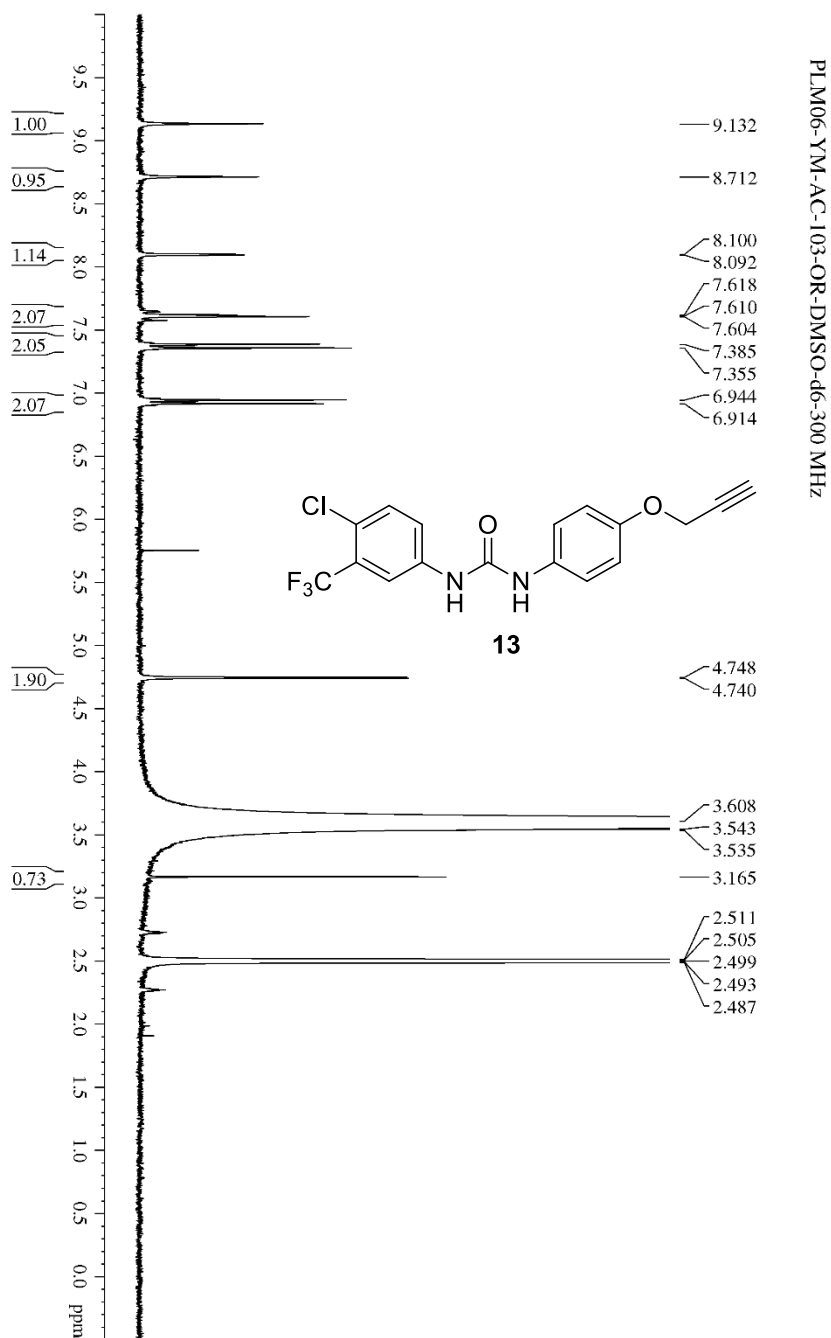
Operator Stuichai Ext: 3560
Instrument micrOTOF Bruker
Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

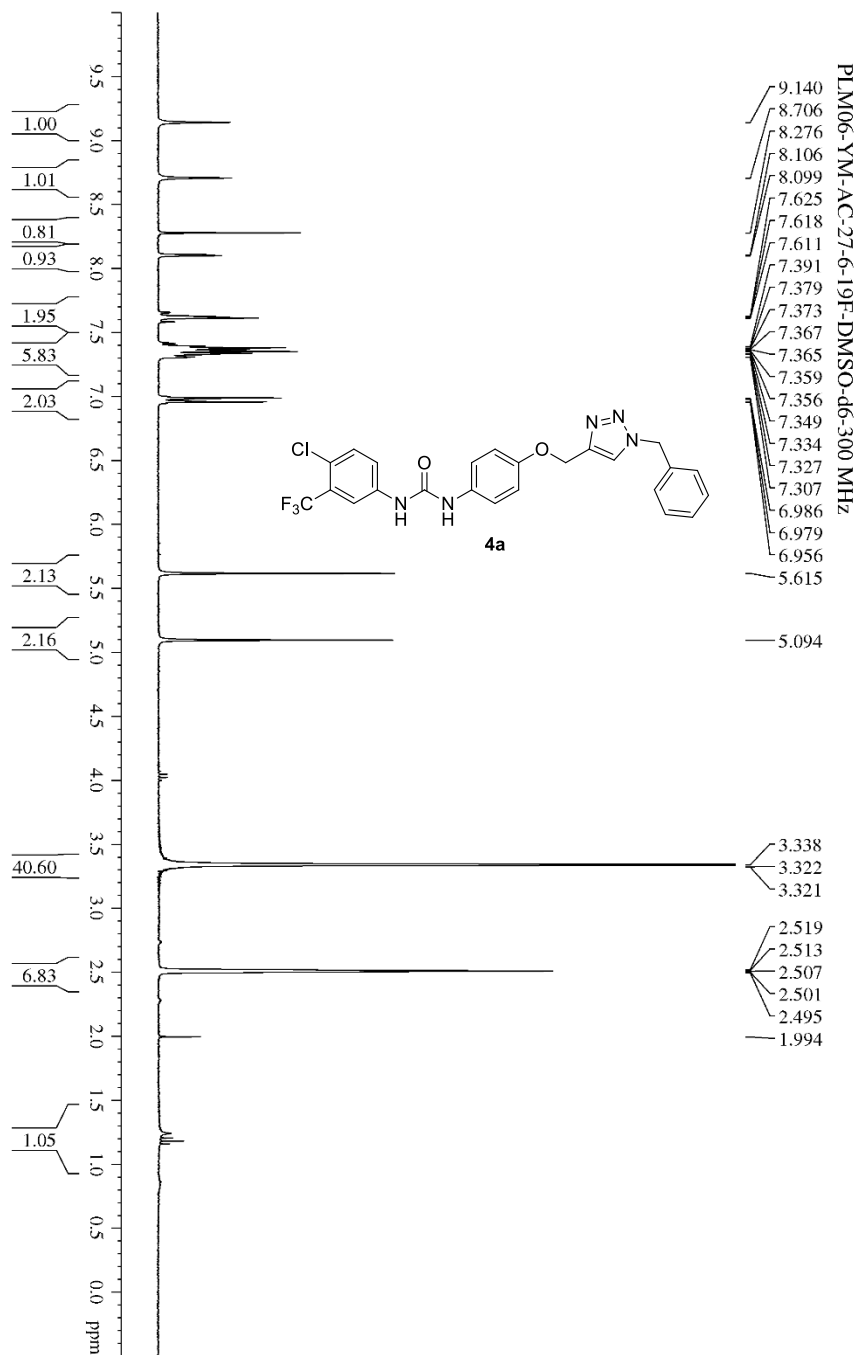
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	150 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



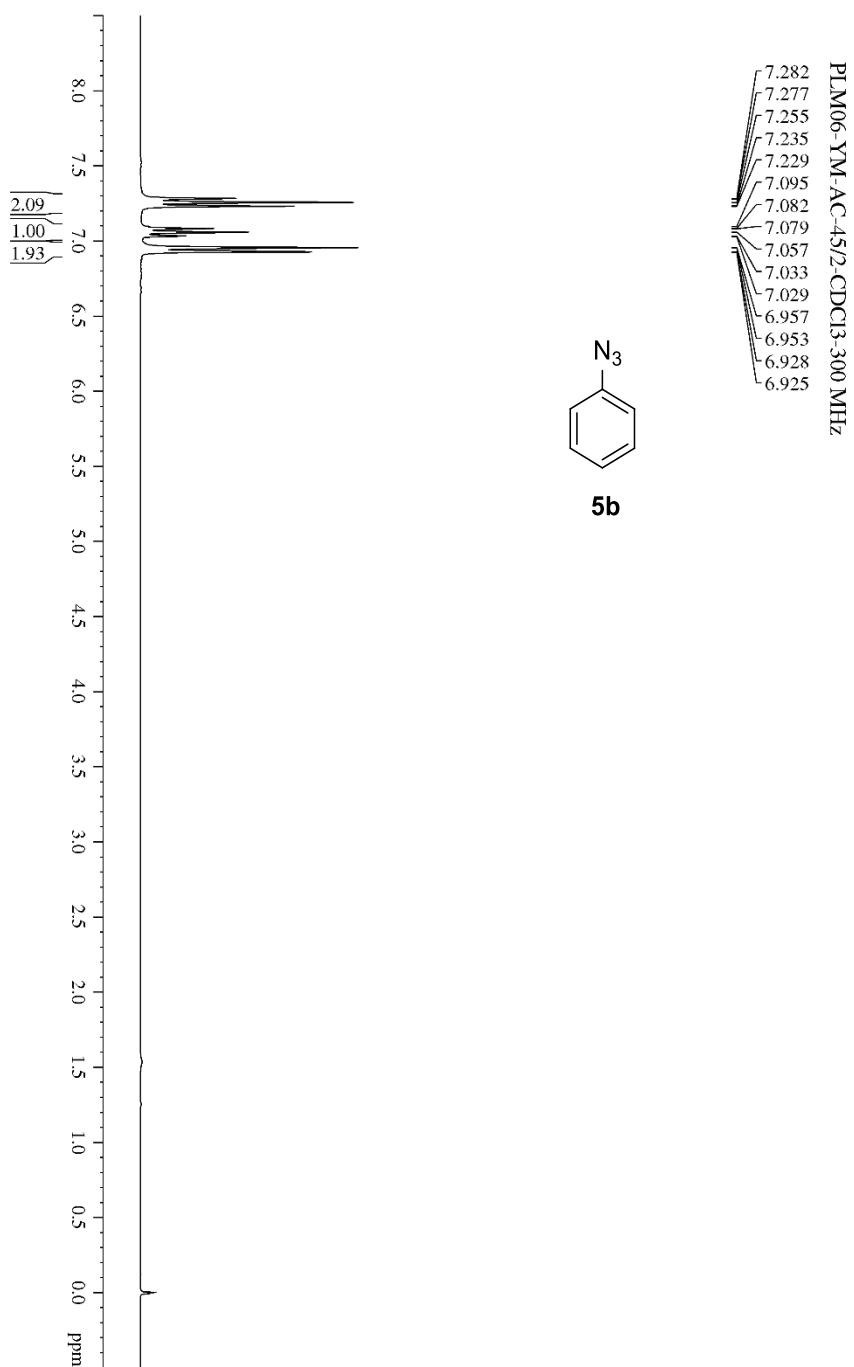
รูปภาพที่ 46 MS สเปกตรัมของ 13



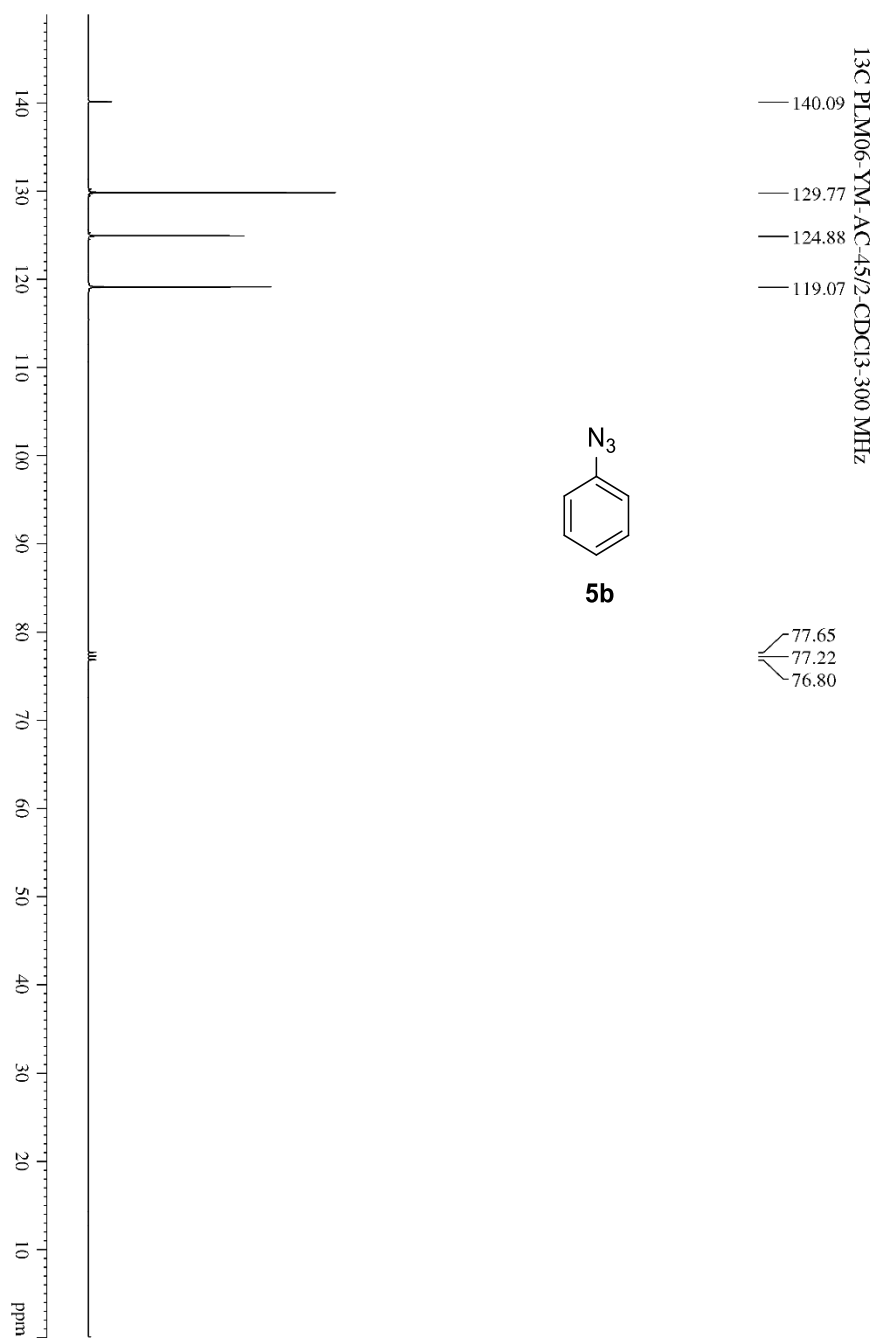
รูปภาพที่ 47 ^1H NMR สเปกตรัมของ **13** จากการสังเคราะห์ด้วยอีกวิธีหนึ่ง



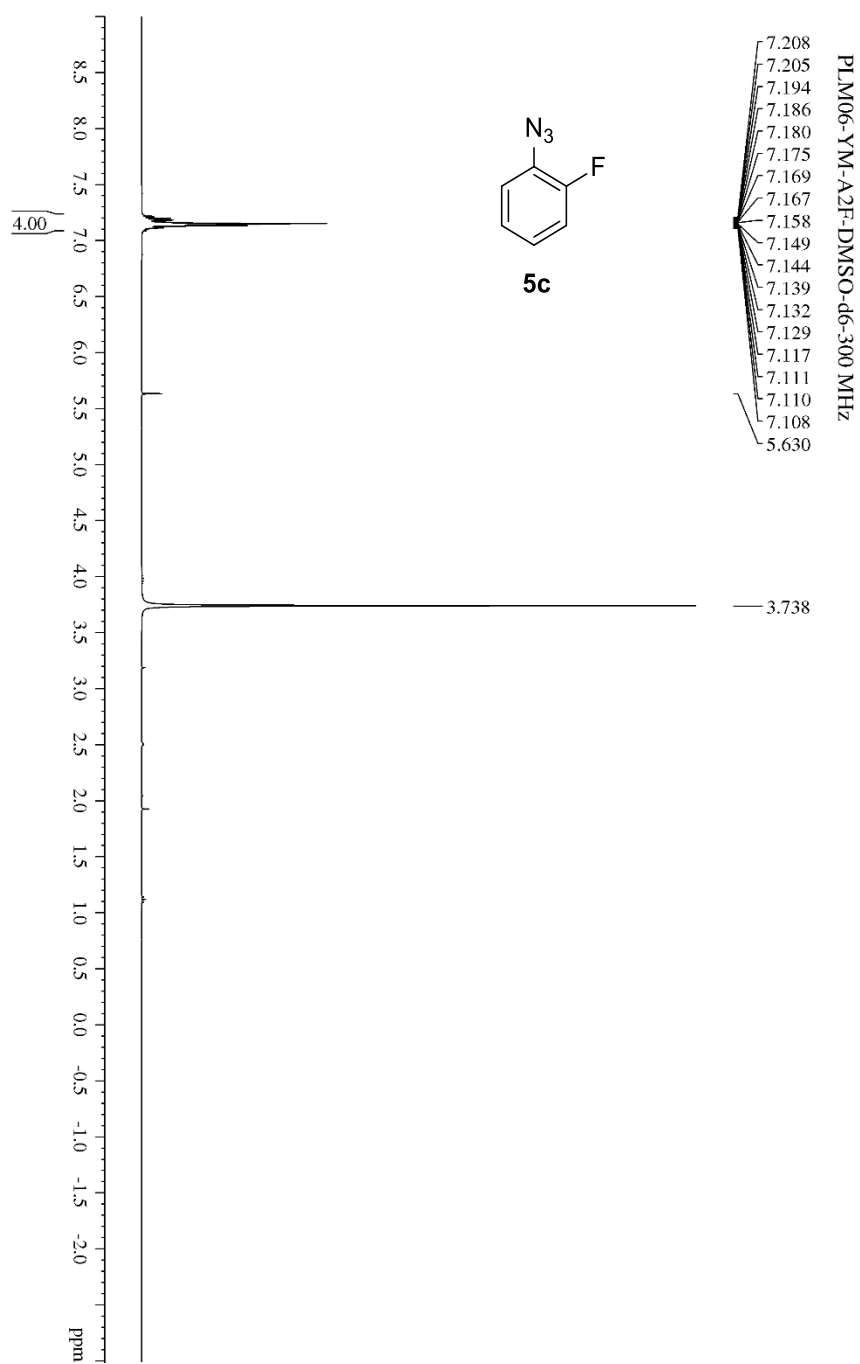
รูปภาพที่ 48 ¹H NMR สเปกตรัมของ **4a** ที่ได้จากการสังเคราะห์โดย route 2



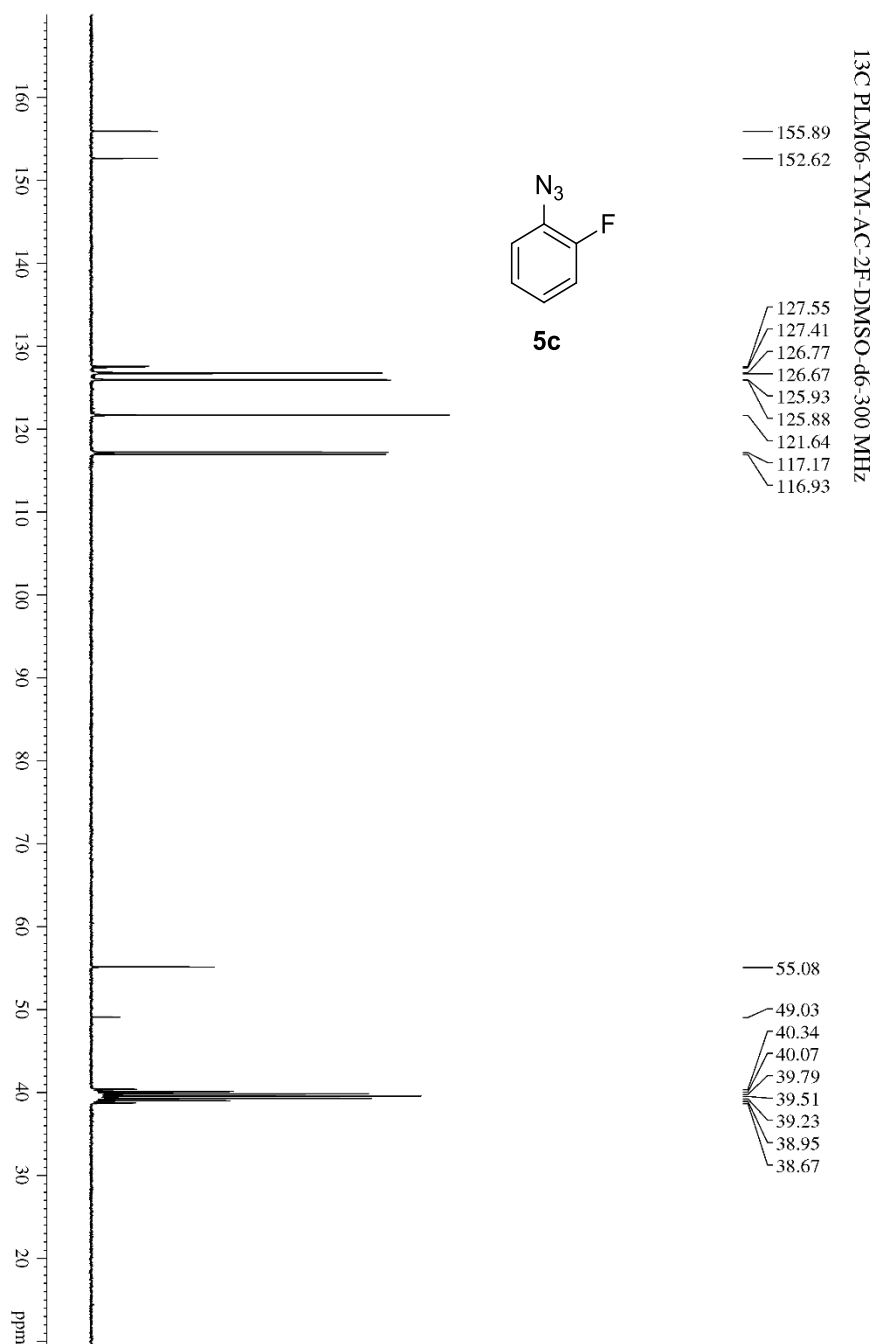
รูปภาพที่ 49 ¹H NMR สเปกตรัมของ Azidobenzene (5b)



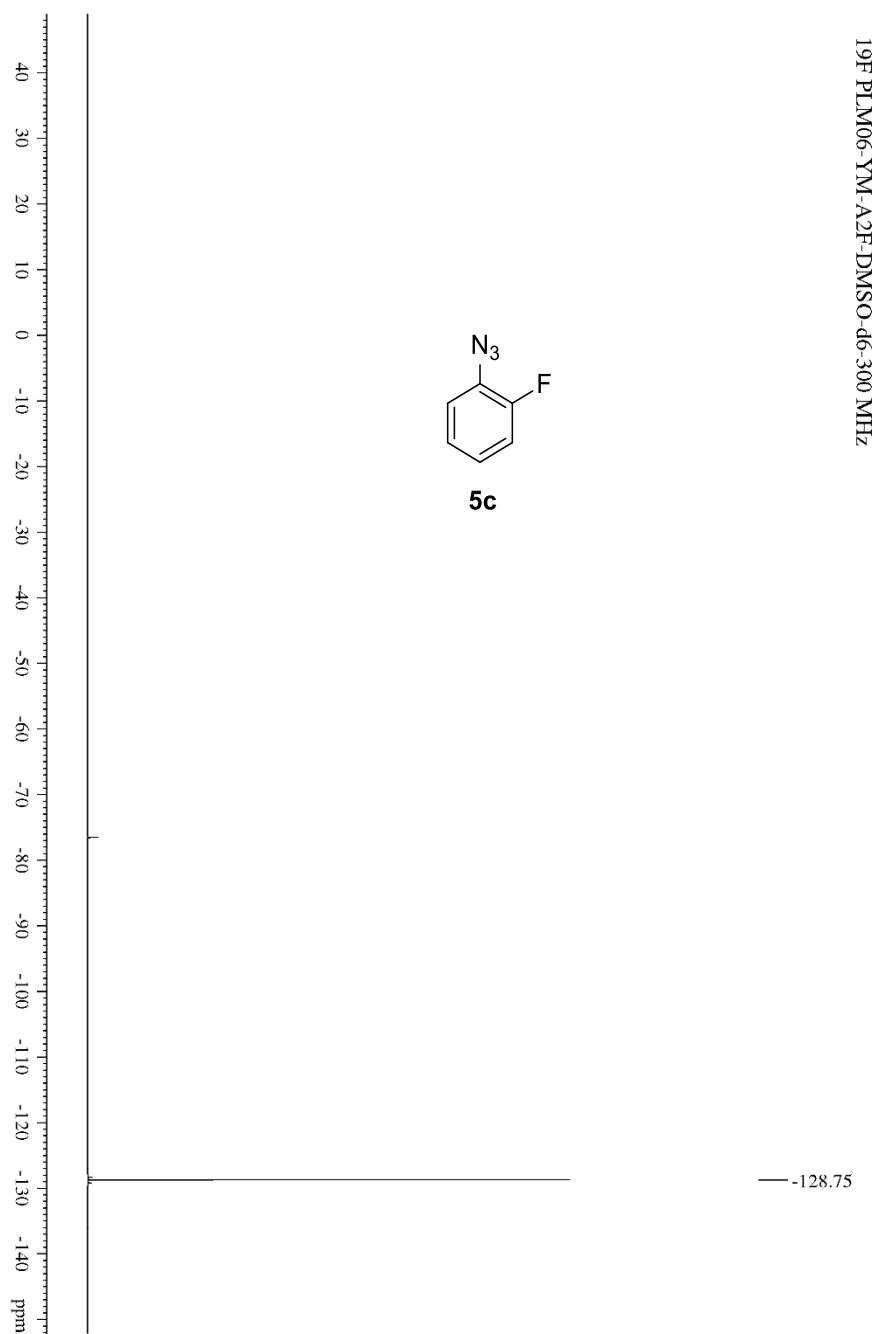
รูปภาพที่ 50 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ Azidobenzene (**5b**)



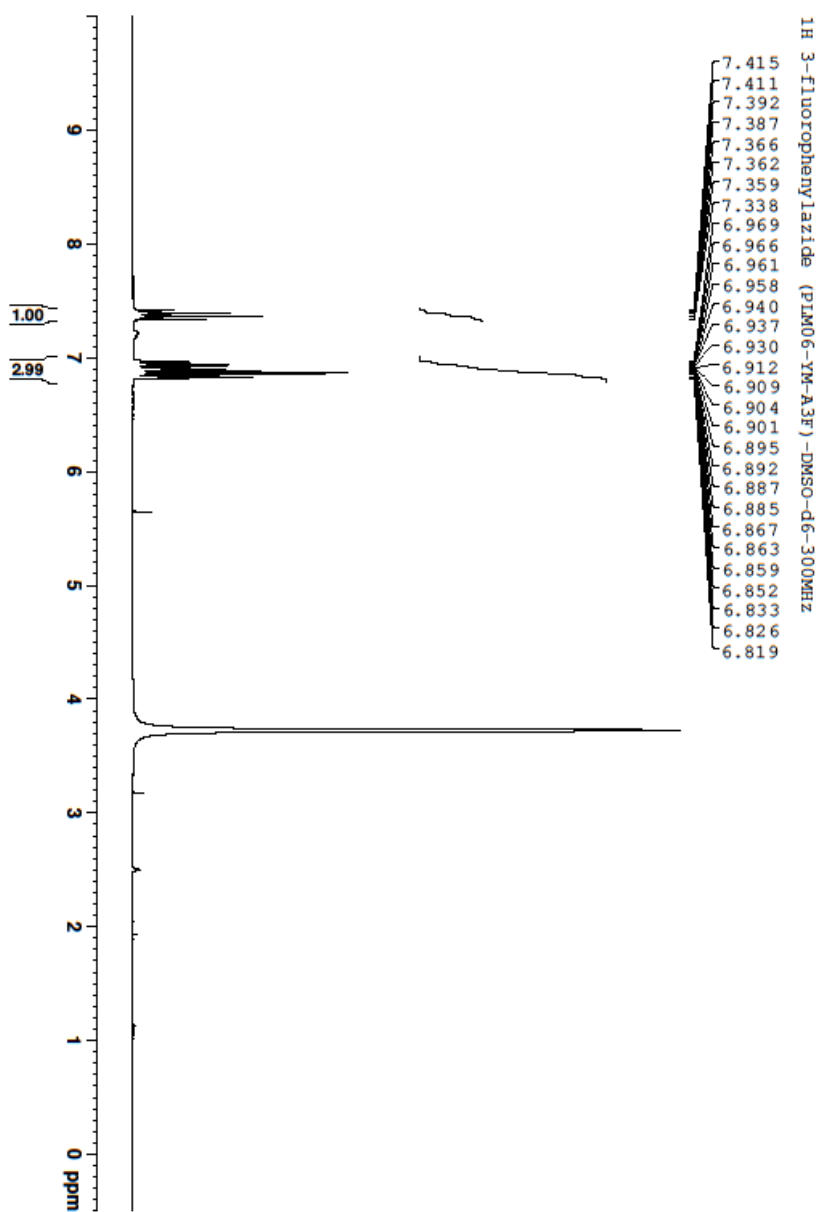
รูปภาพที่ 51 $^1\text{H NMR}$ สเปกตรัมของ 1-Azido-2-fluorobenzene (**5c**)



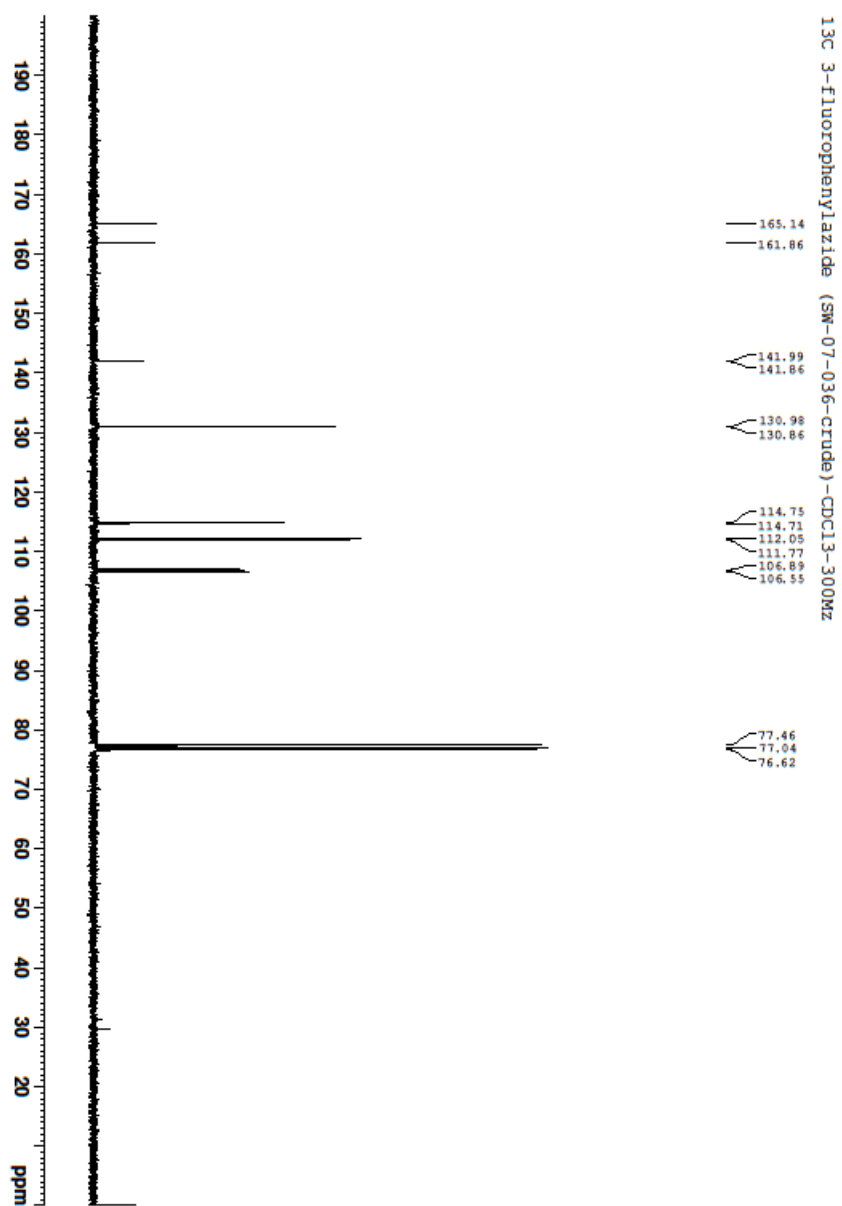
รูปภาพที่ 52 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-2-fluorobenzene (5c)



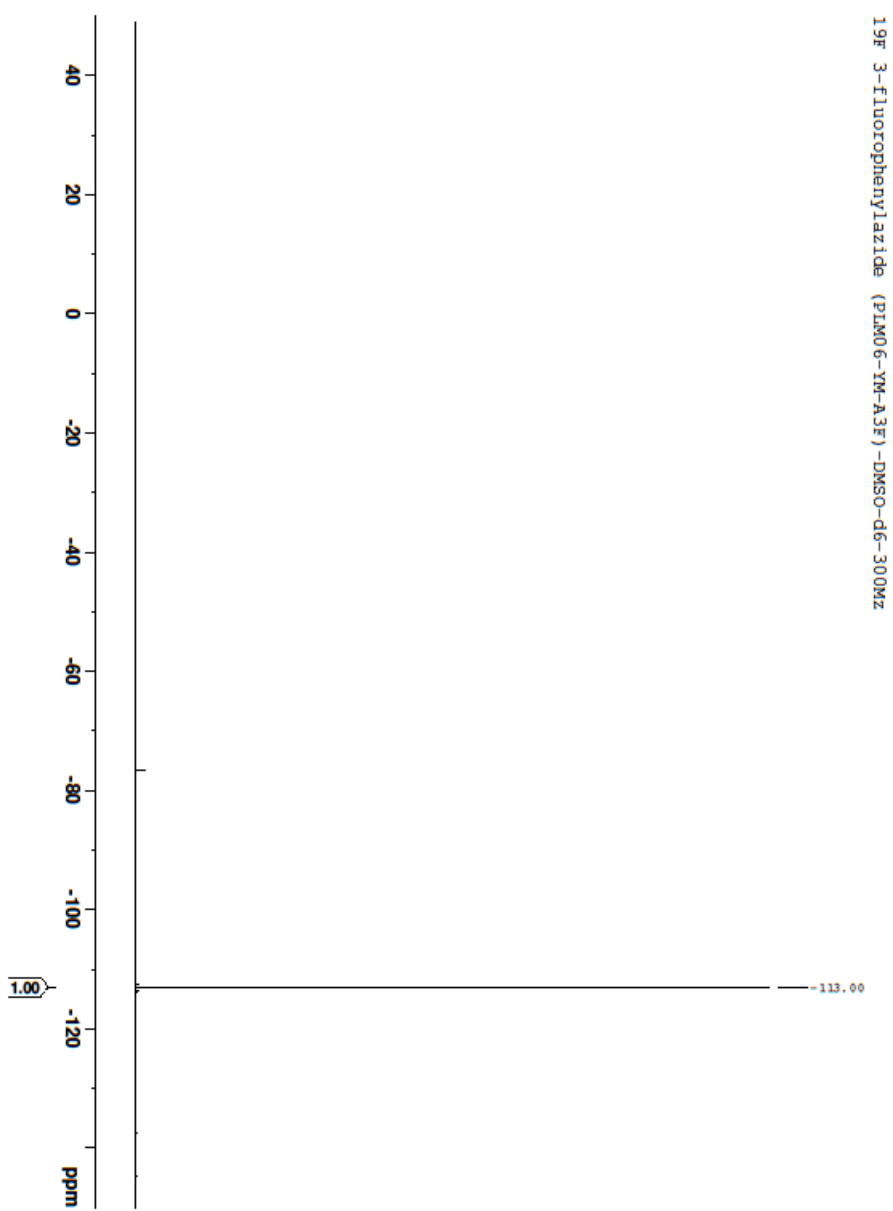
รูปภาพที่ 53 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-2-fluorobenzene (**5c**)



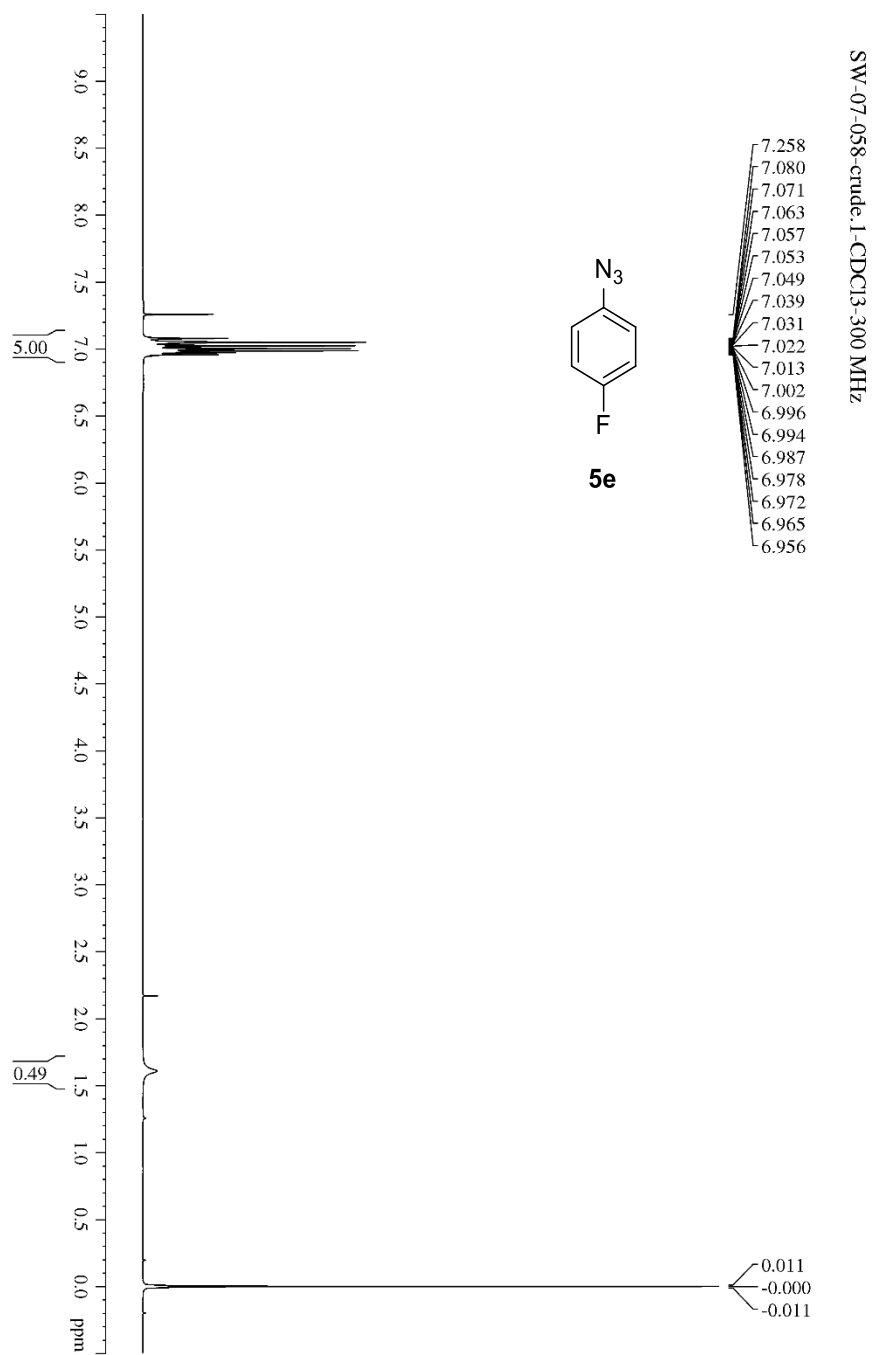
รูปภาพที่ 54 ¹H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-3-fluorobenzene (5d)



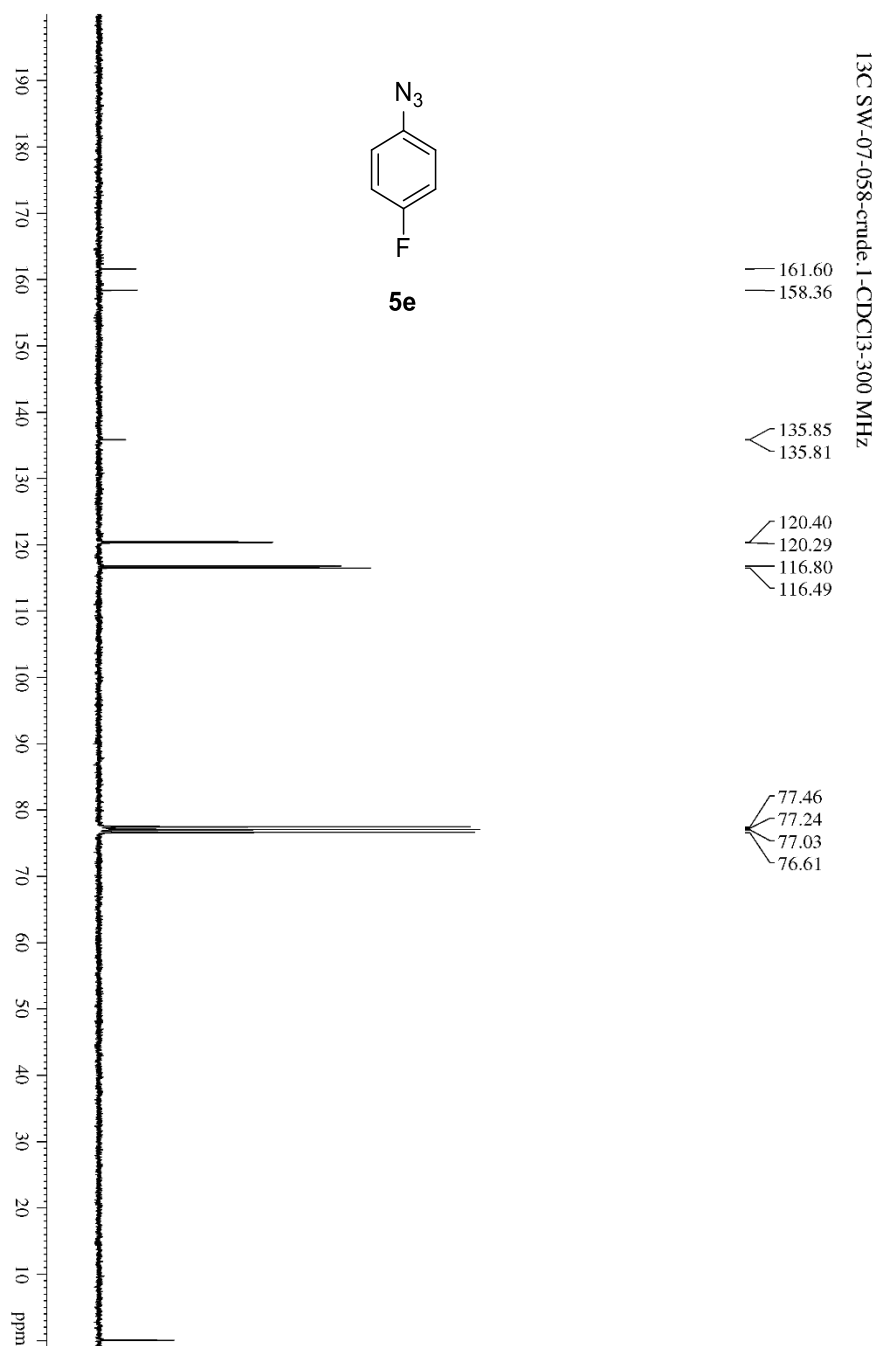
รูปภาพที่ 55 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-3-fluorobenzene (5d)



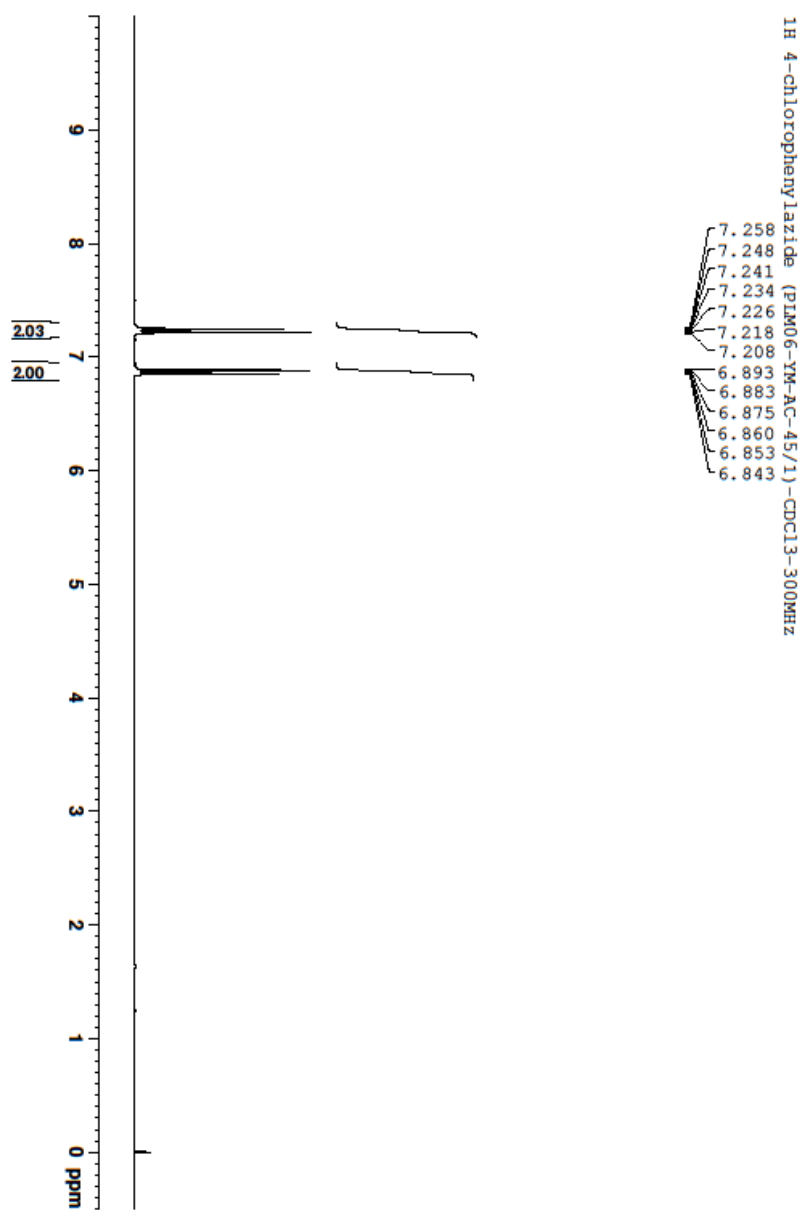
รูปภาพที่ 56 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-3-fluorobenzene (5d)



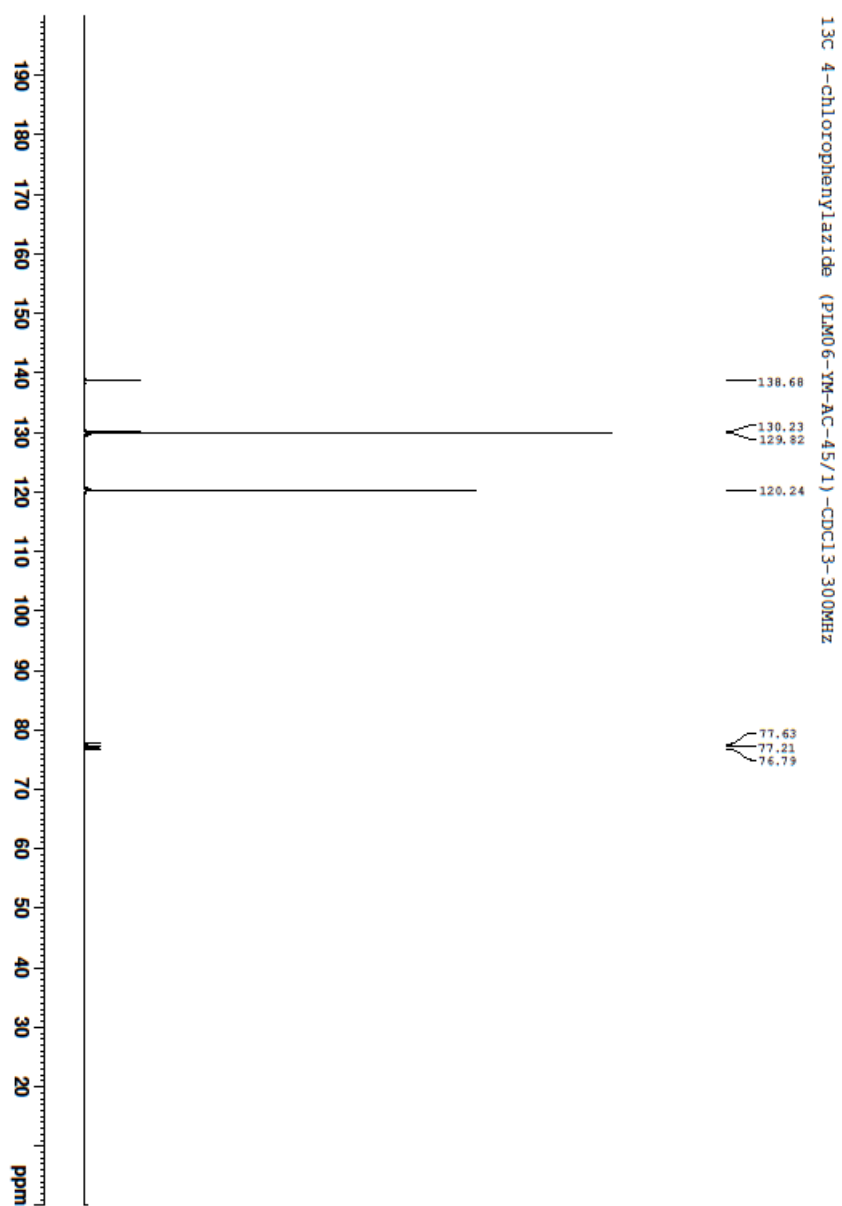
รูปภาพที่ 57 ^1H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-fluorobenzene (**5e**)



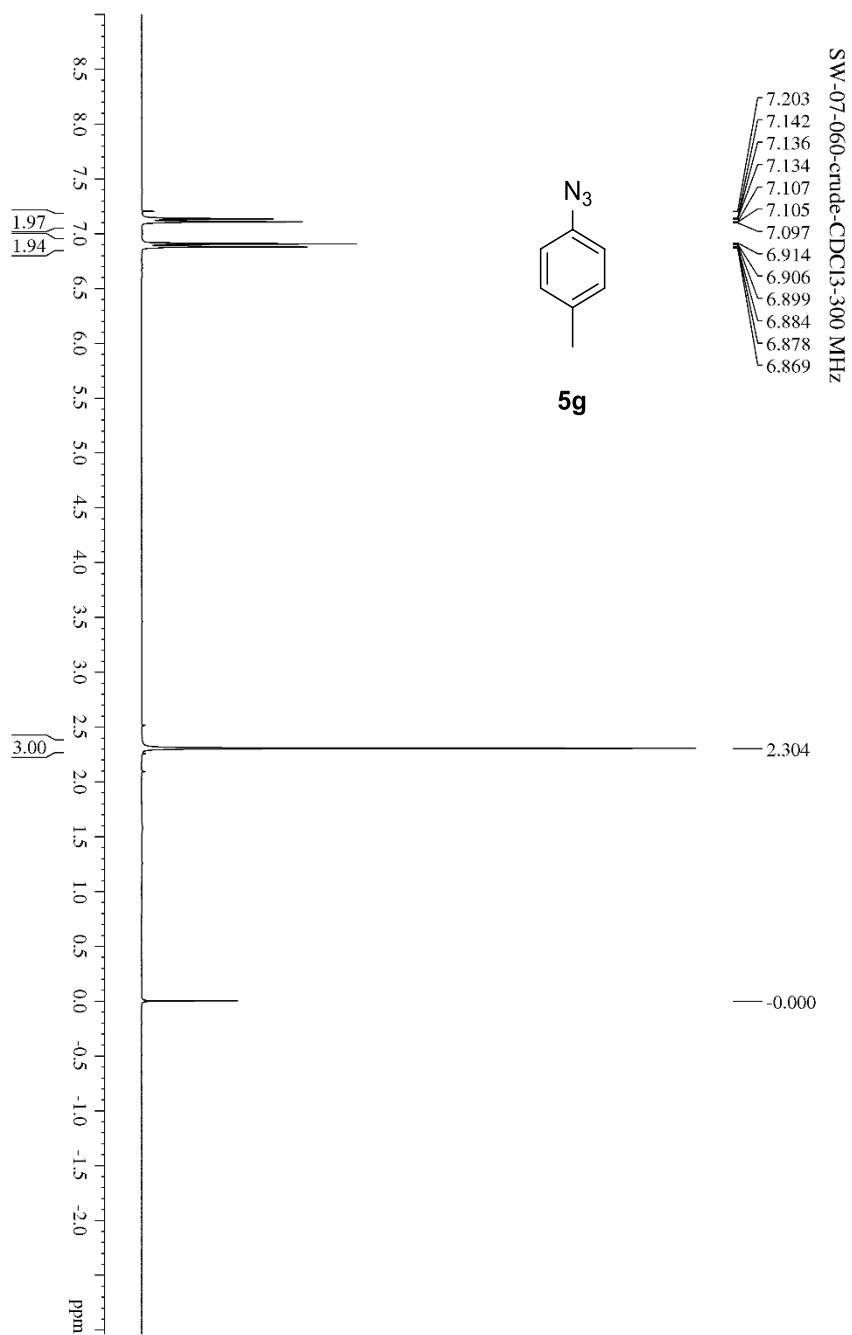
รูปภาพที่ 58 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-fluorobenzene (5e)



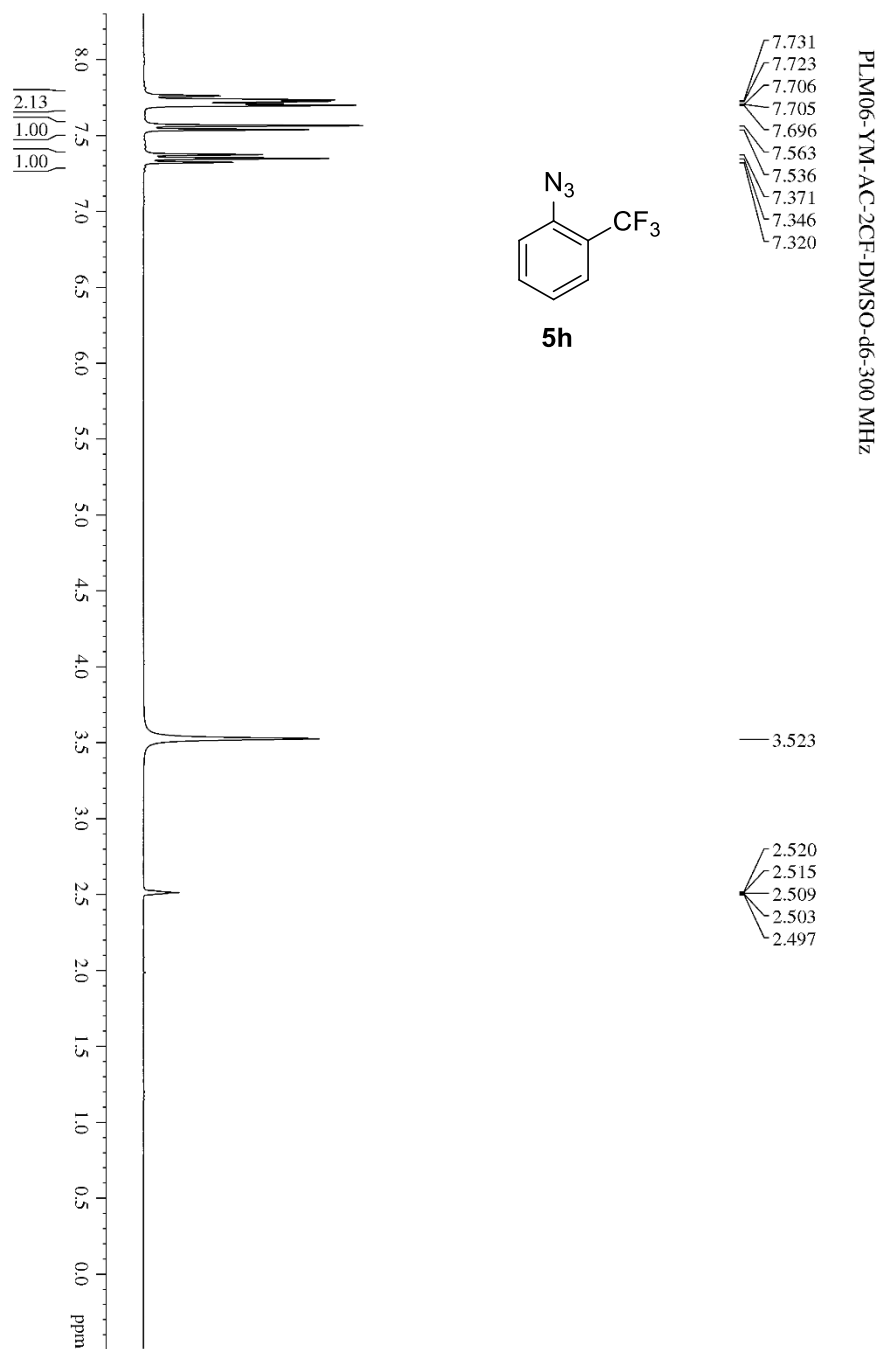
รูปภาพที่ 59 ¹H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-chlorobenzene (5f)



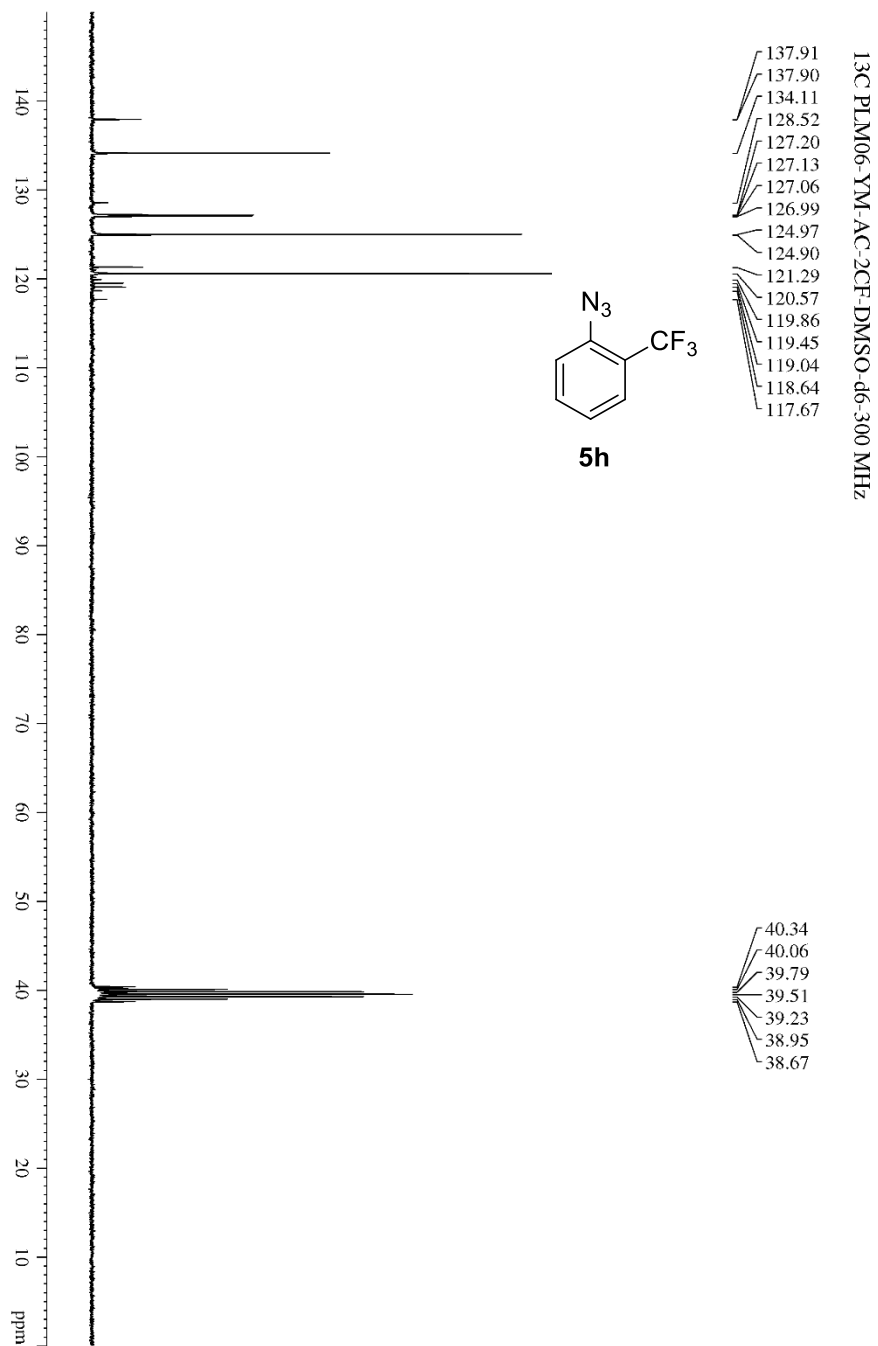
รูปภาพที่ 60 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-chlorobenzene (5f)



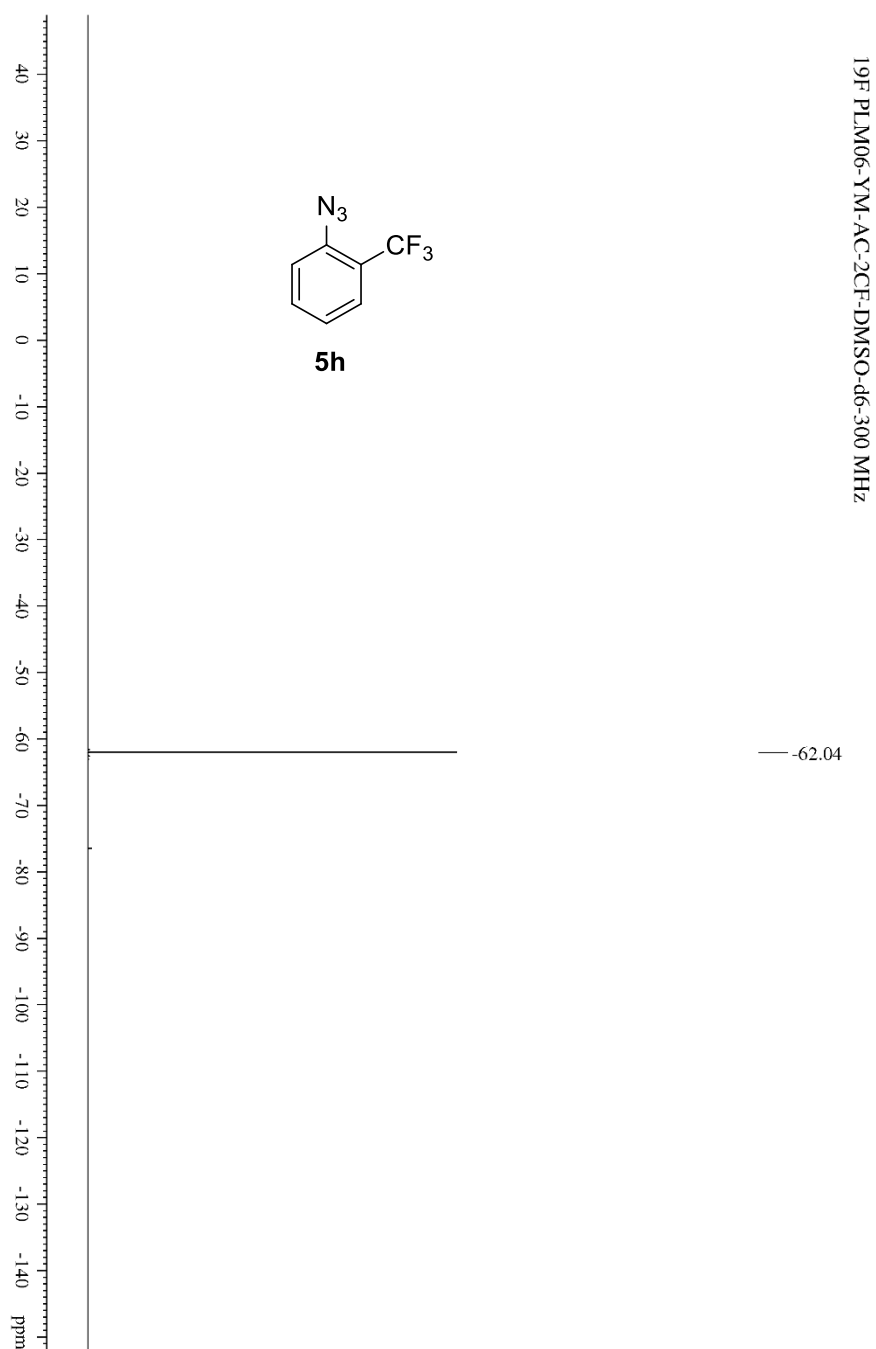
รูปภาพที่ 61 ¹H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-methylbenzene (5g)



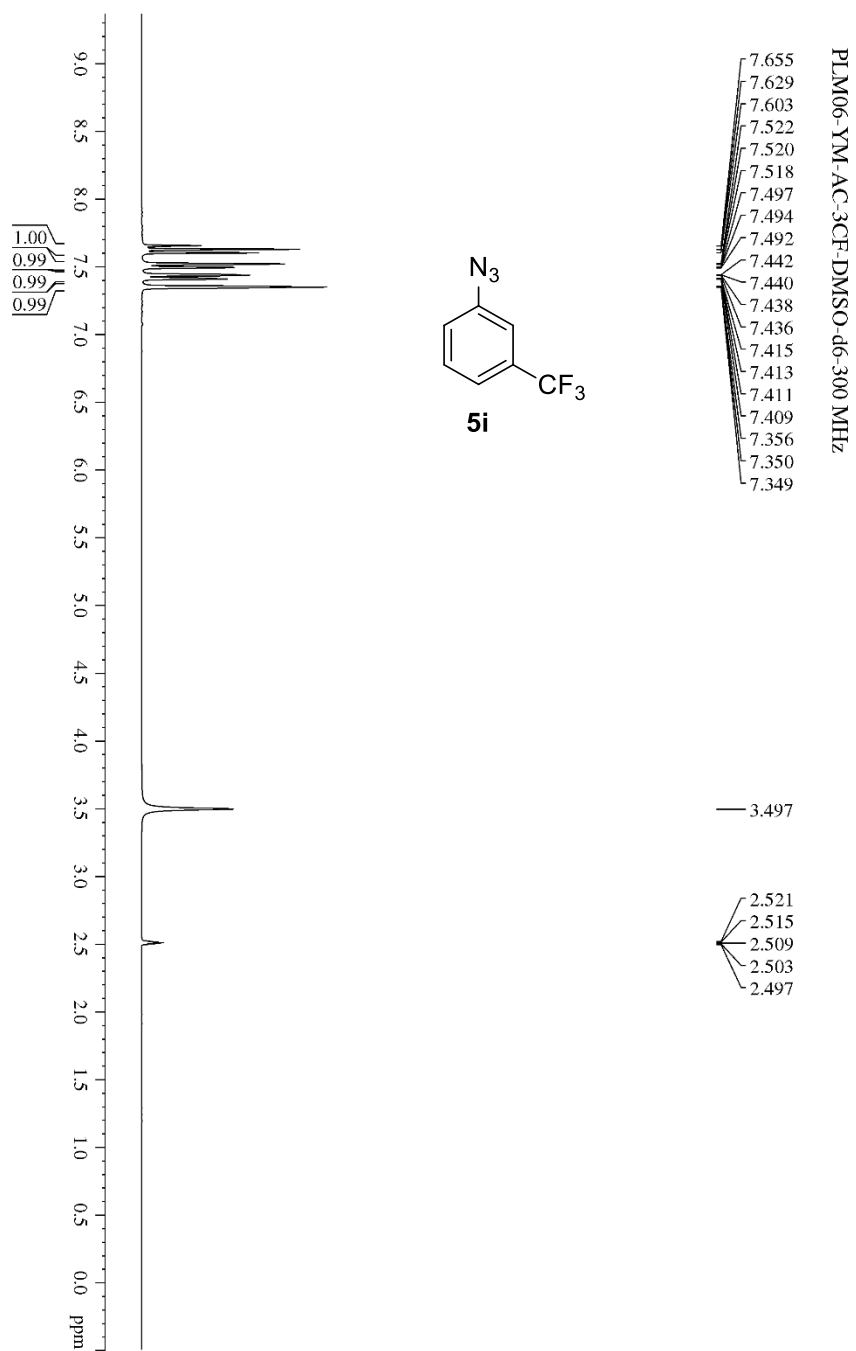
รูปภาพที่ 62 ¹H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-2-(trifluoromethyl)benzene (**5h**)



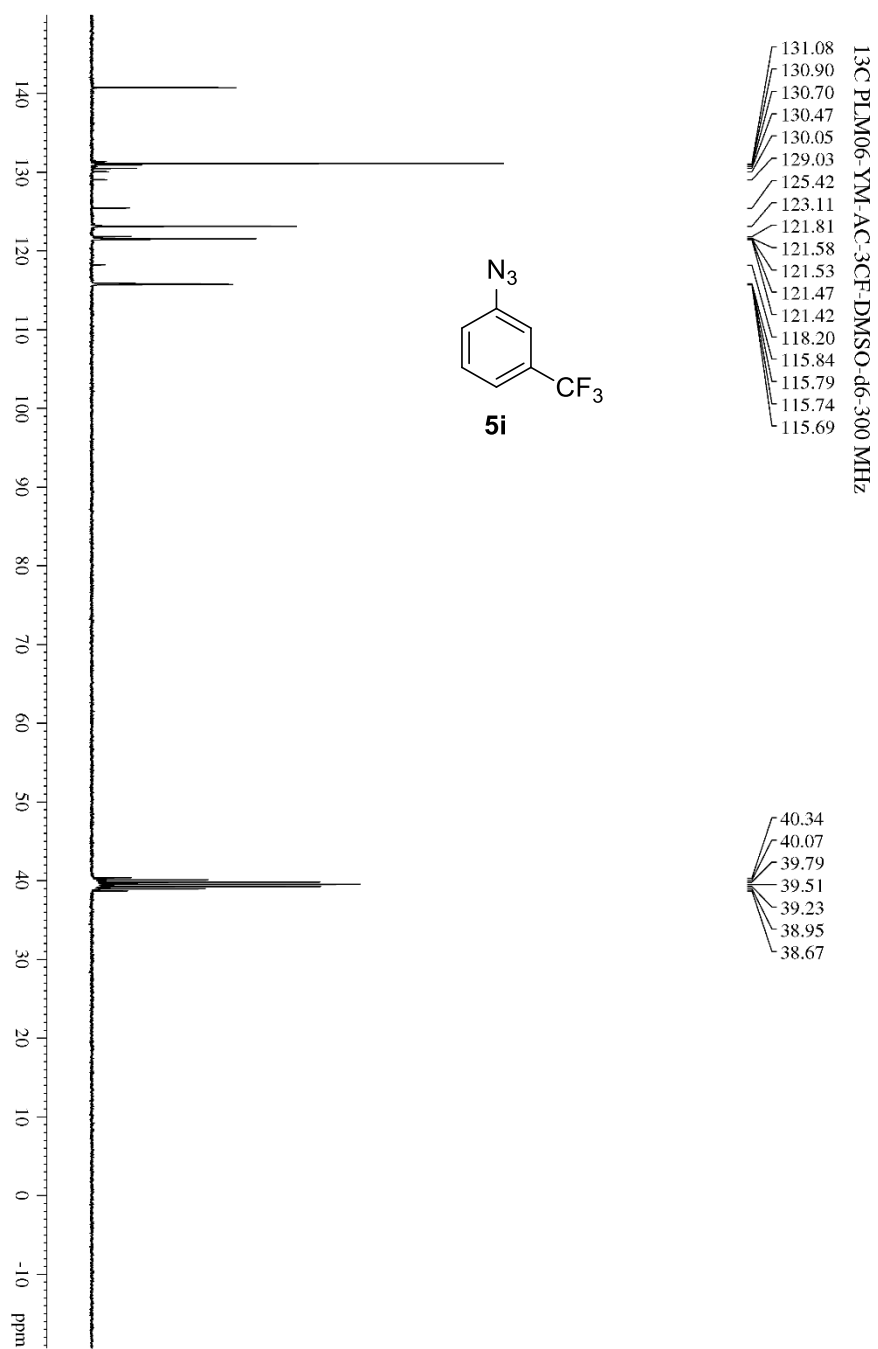
รูปภาพที่ 63 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-2-(trifluoromethyl)benzene (5h)



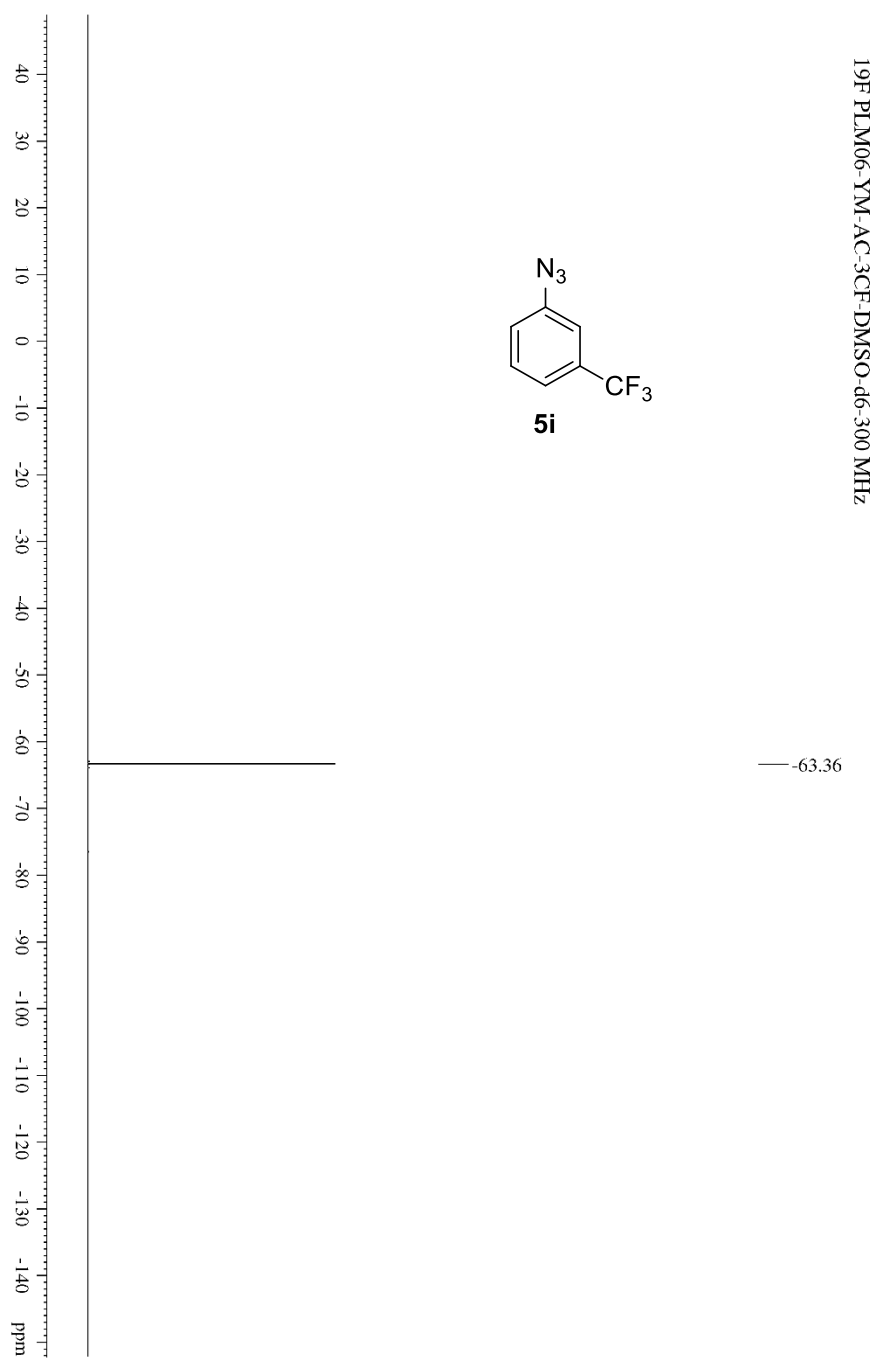
รูปภาพที่ 64 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-2-(trifluoromethyl)benzene (5h)



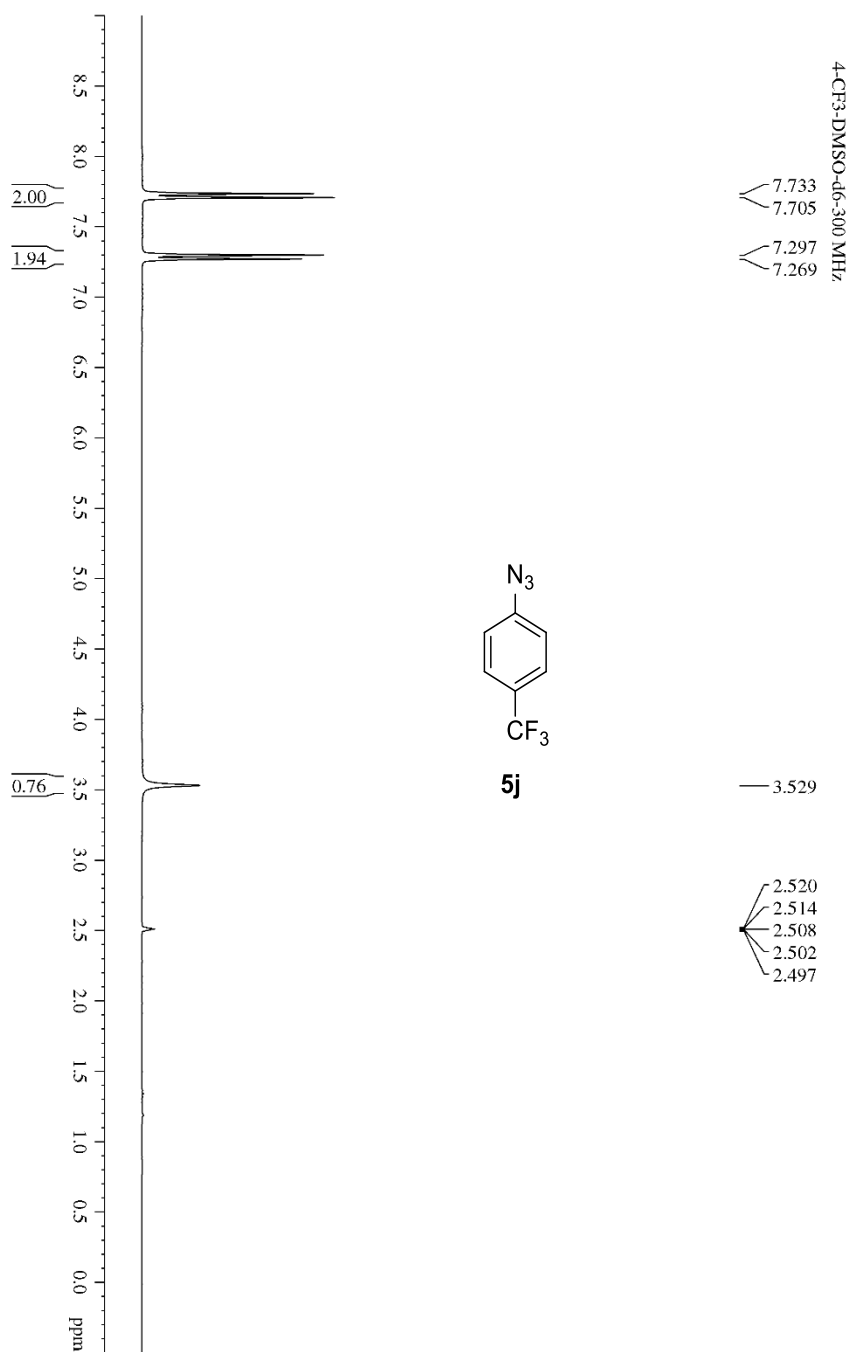
รูปภาพที่ 65 ^1H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-3-(trifluoromethyl)benzene (5i)



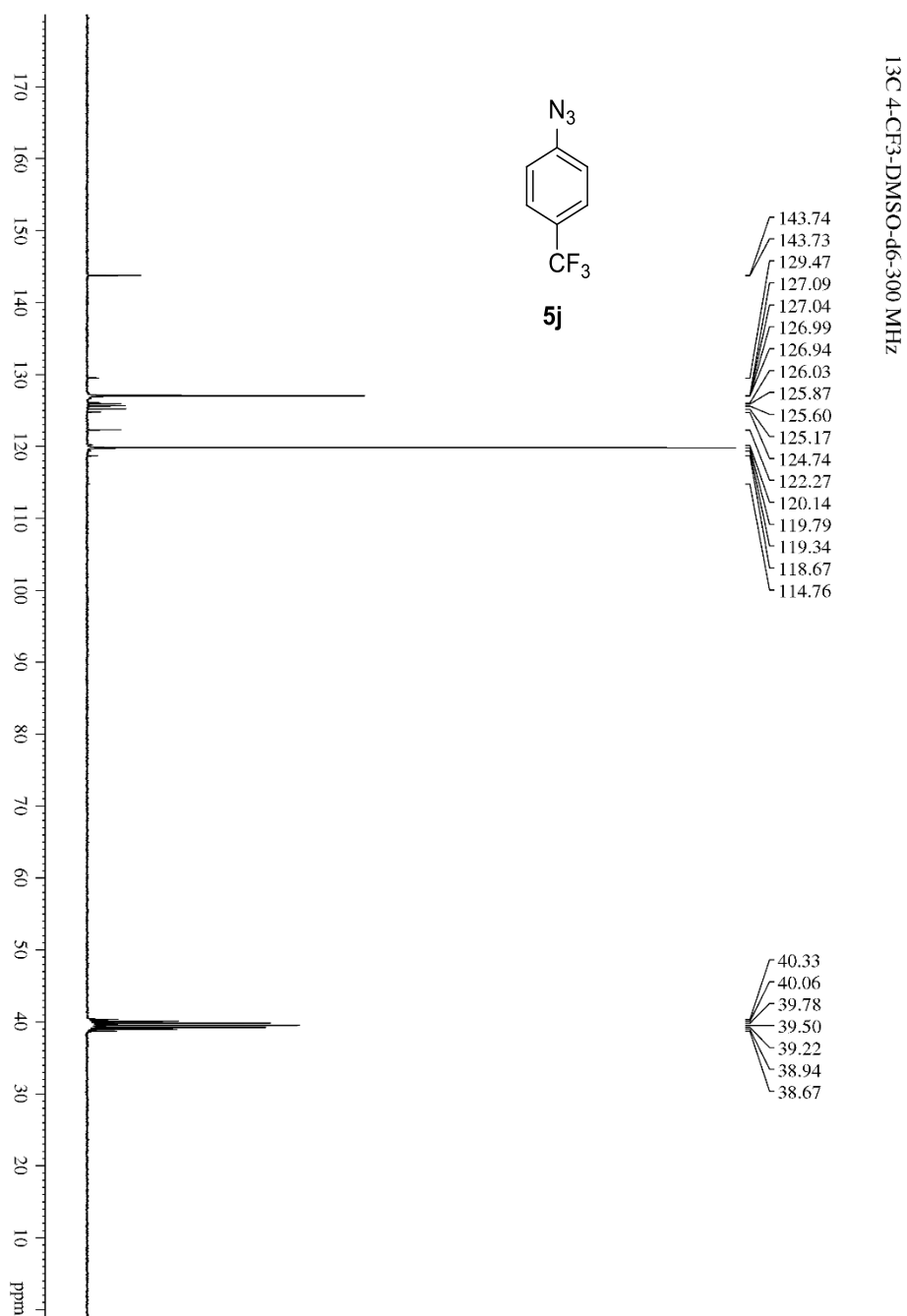
รูปภาพที่ 66 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**5i**)



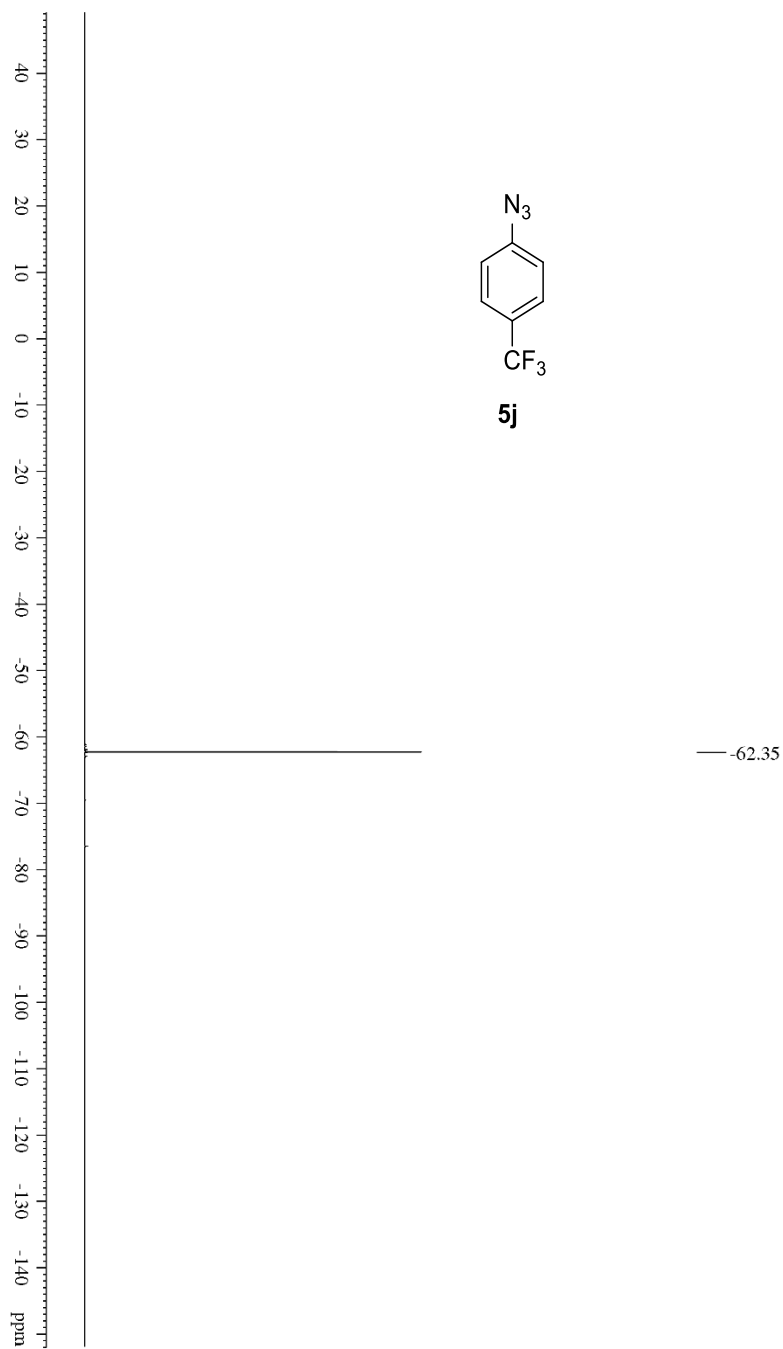
รูปภาพที่ 67 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-3-(trifluoromethyl)benzene (**5i**)

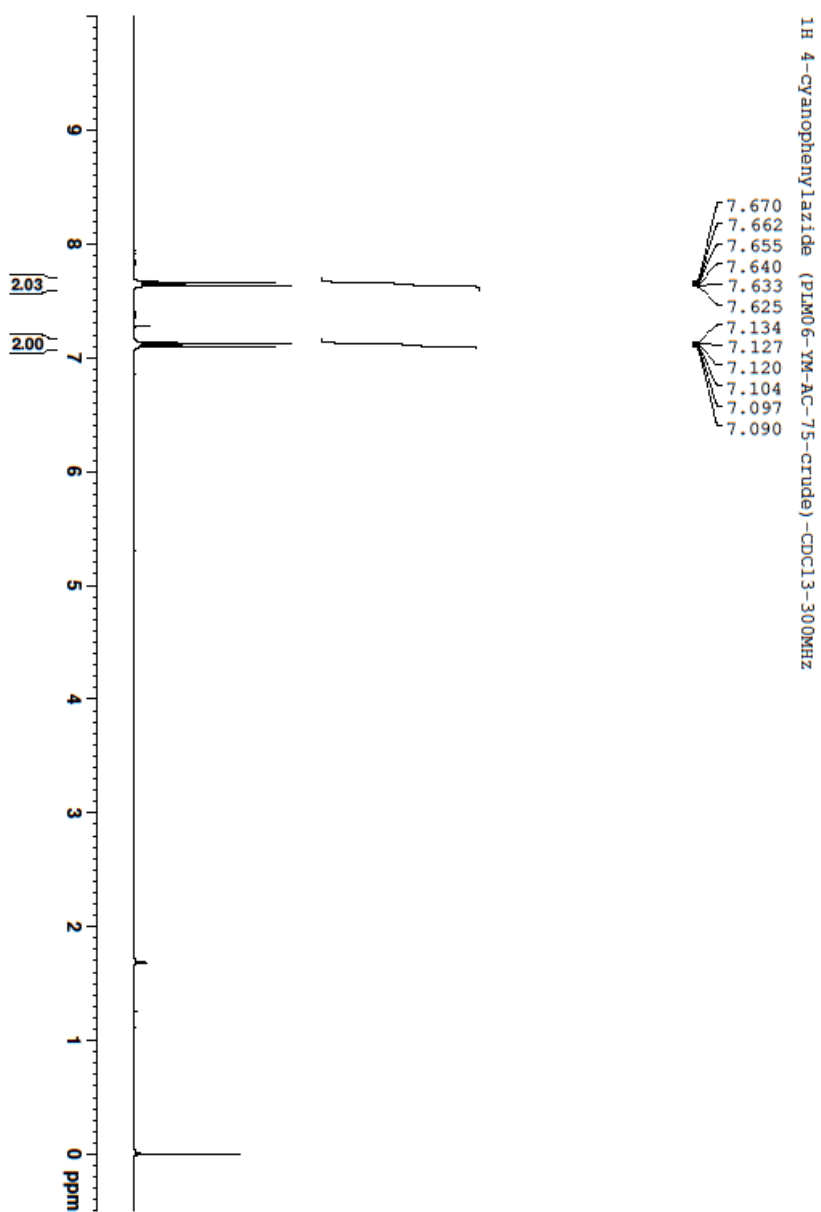


รูปภาพที่ 68 ¹H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-(trifluoromethyl)benzene (5j)

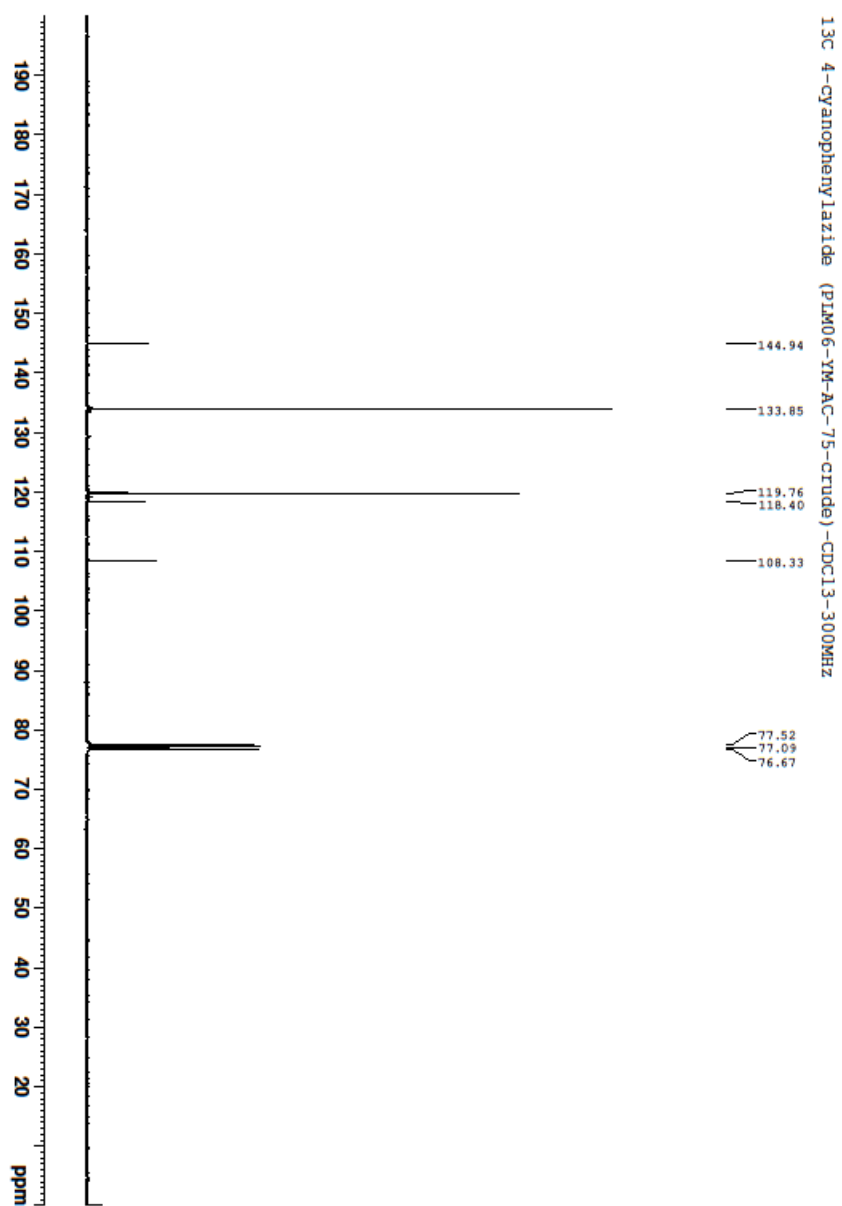


รูปภาพที่ 69 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-(trifluoromethyl)benzene (5j)

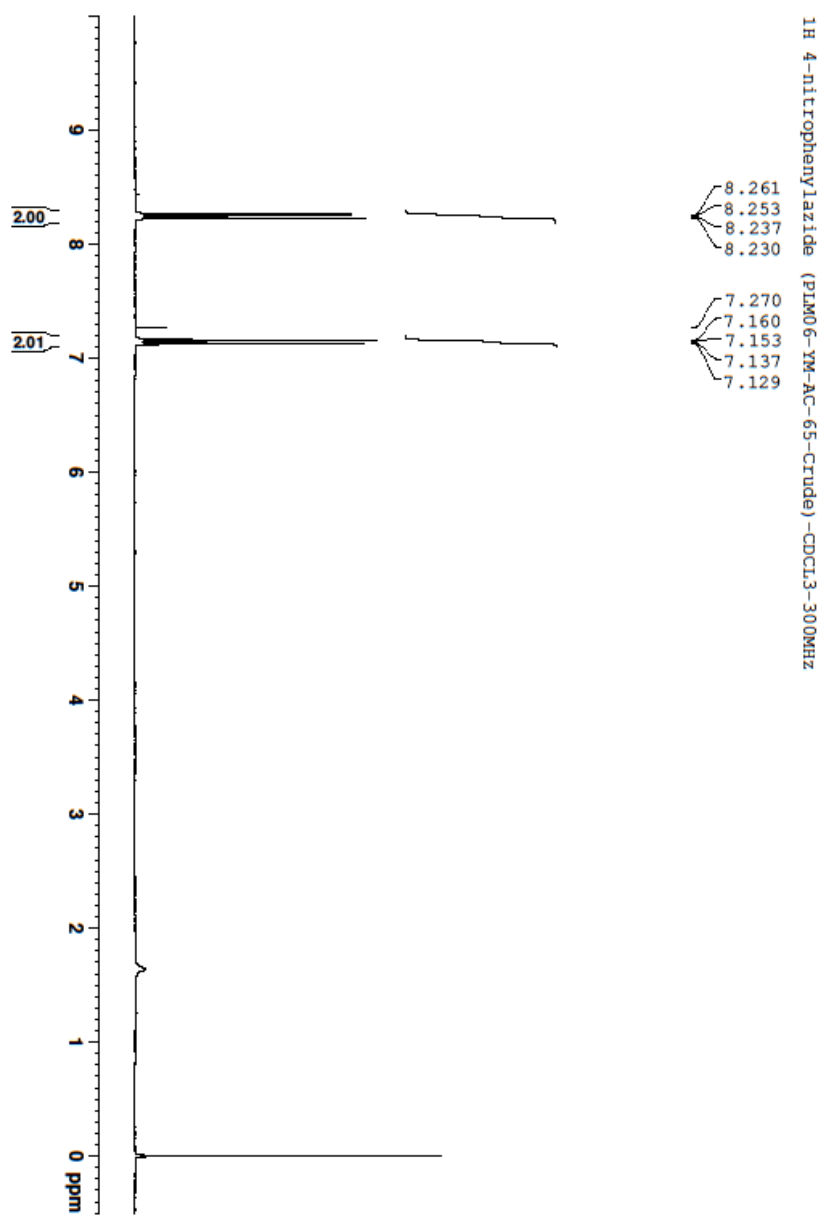
^{19}F 4- CF_3 -DMSO- d_6 -300 MHzรูปภาพที่ 70 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-(trifluoromethyl)benzene (5j)



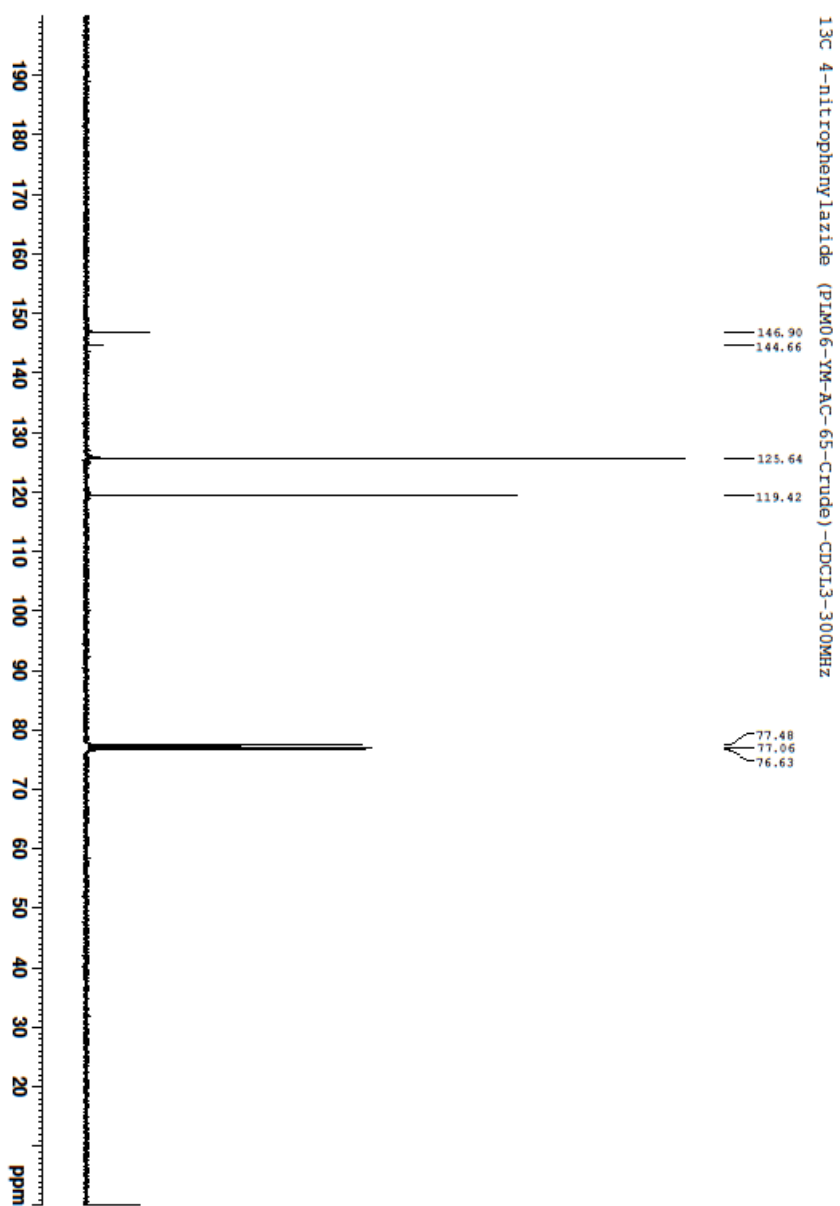
รูปภาพที่ 71 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4-Azidobenzonitrile (5k)



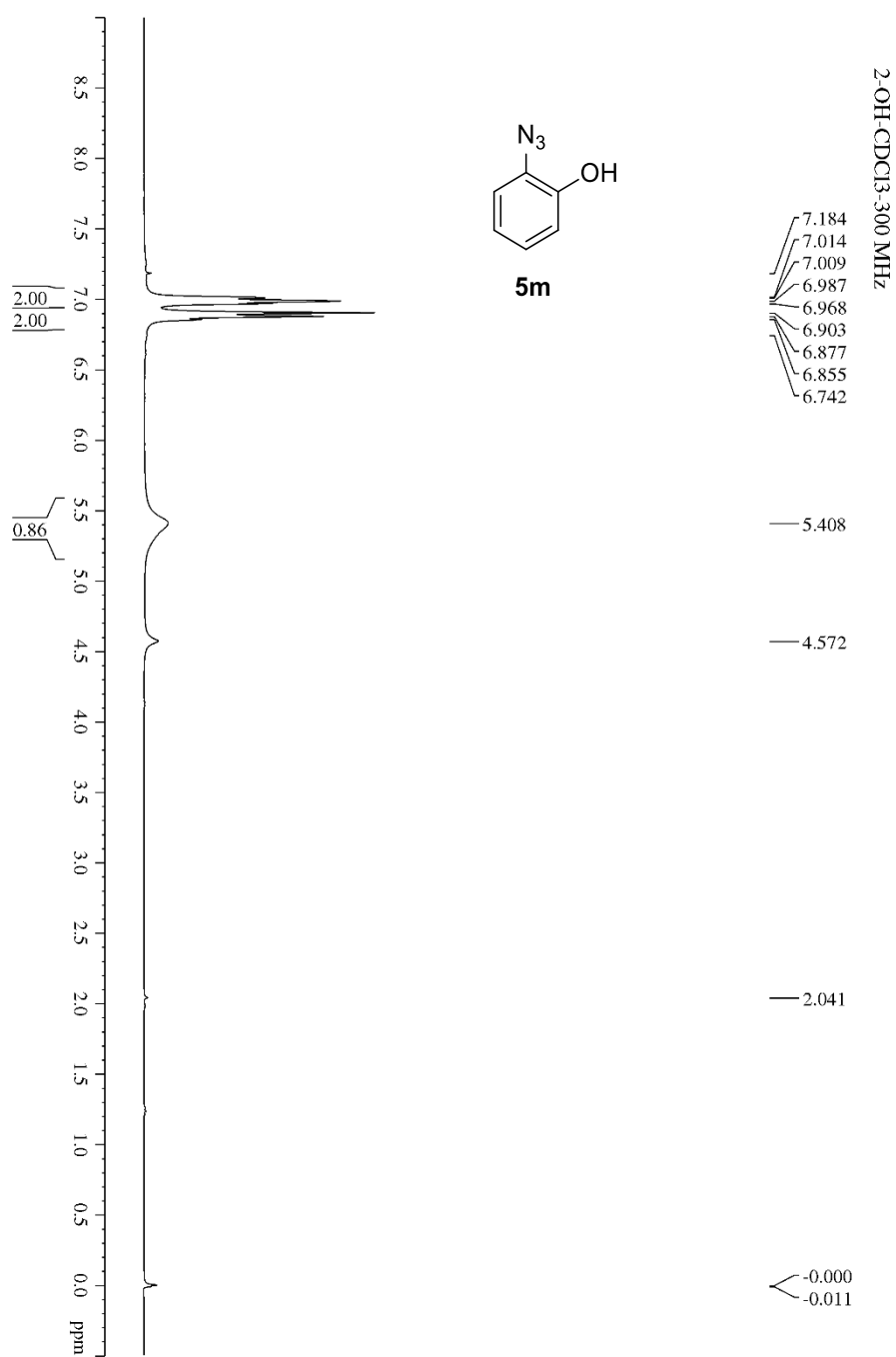
รูปภาพที่ 72 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4-Azidobenzonitrile (5k)



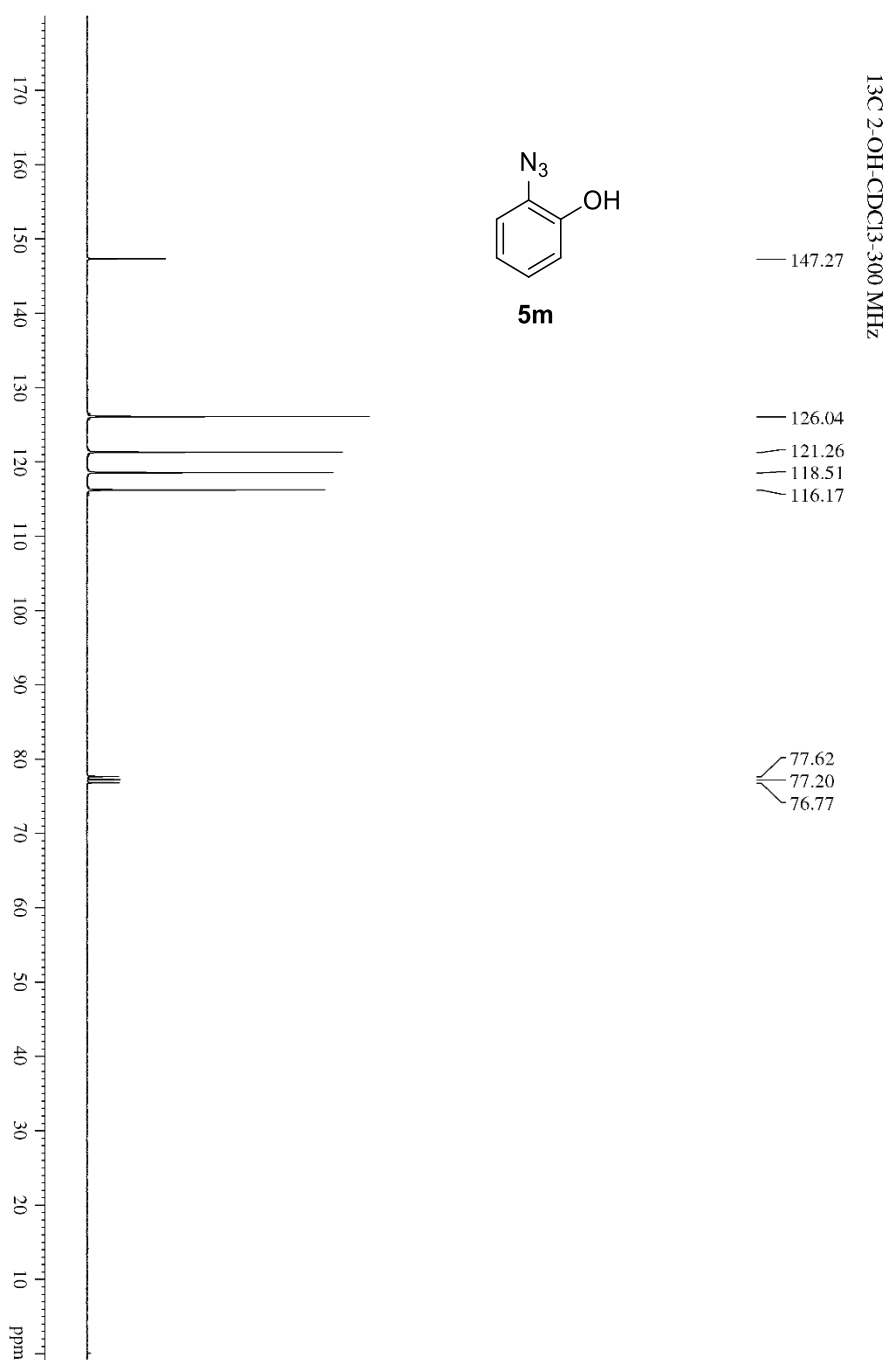
รูปภาพที่ 73 ¹H NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-nitrobenzene (5U)



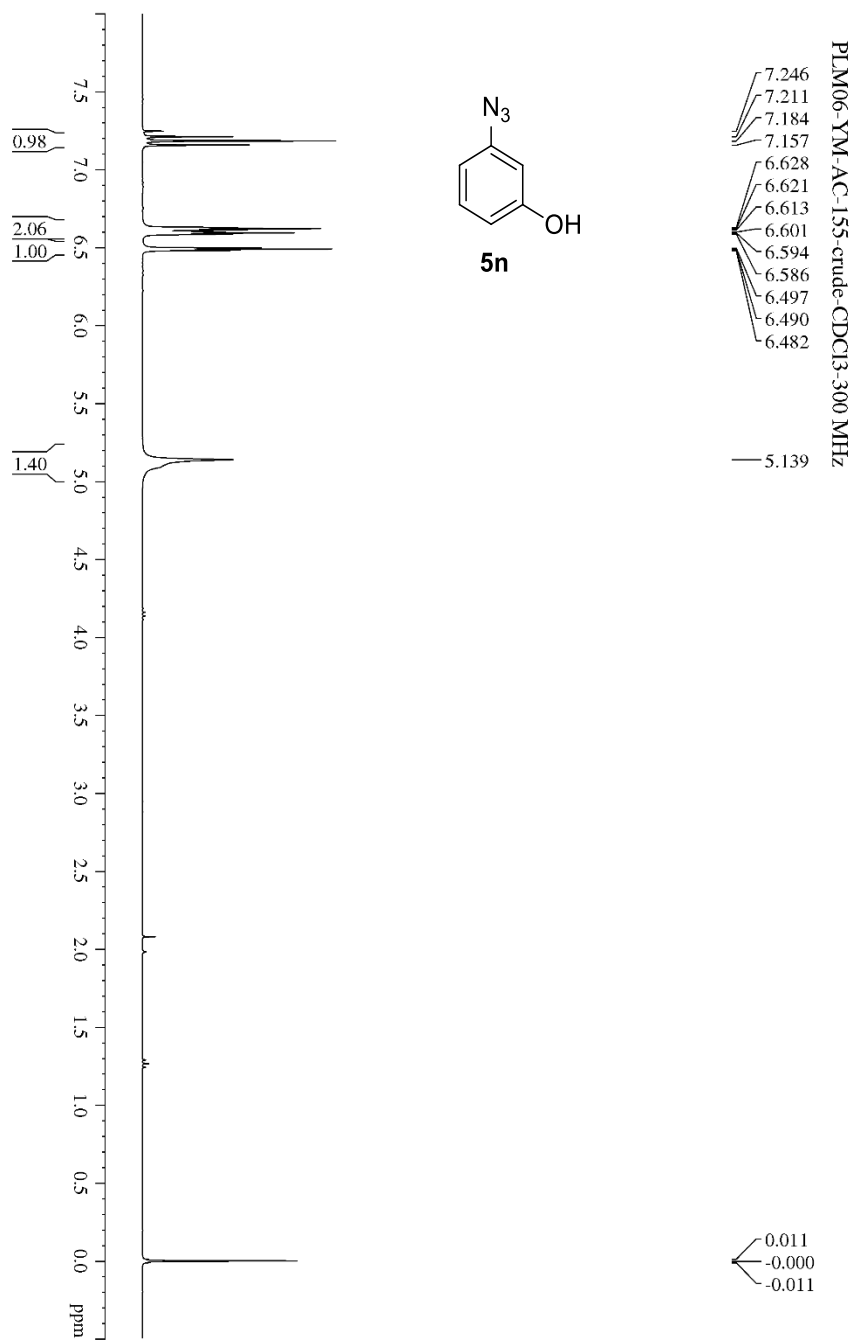
รูปภาพที่ 74 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 1-Azido-4-nitrobenzene (5l)



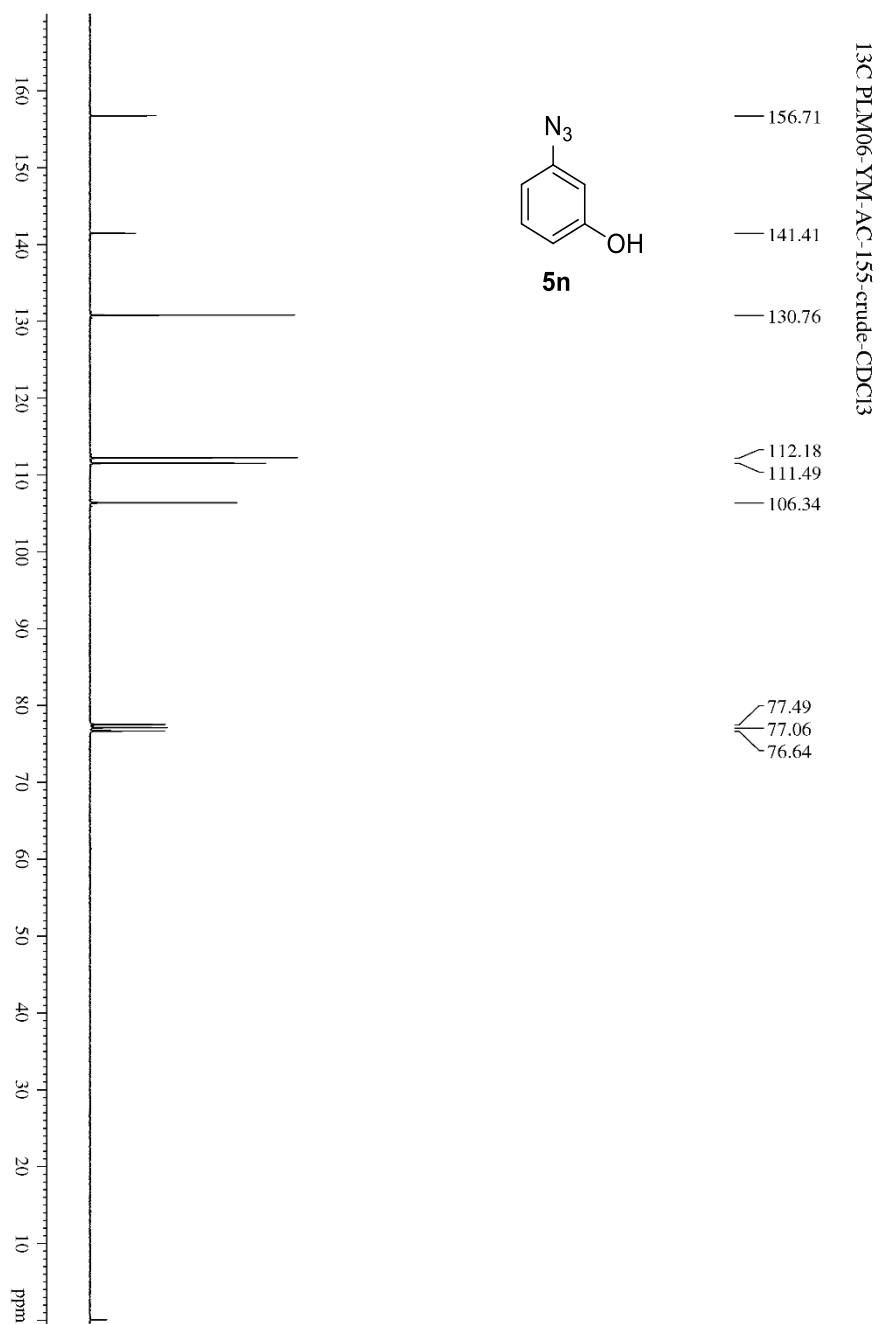
รูปภาพที่ 75 ¹H NMR สเปกตรัมของ 2-azidophenol (5m)

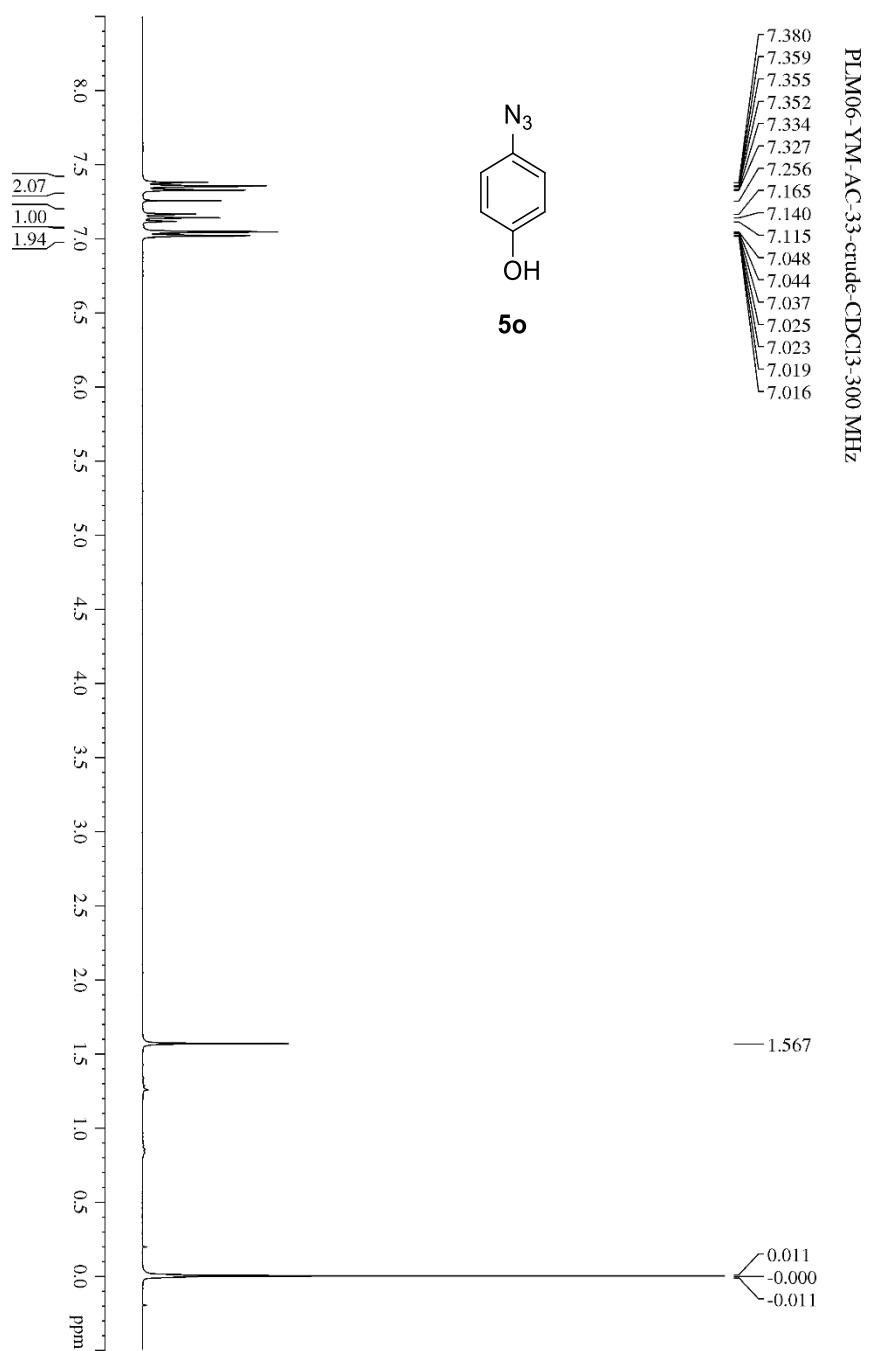


รูปภาพที่ 76 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 2-azidophenol (5m)

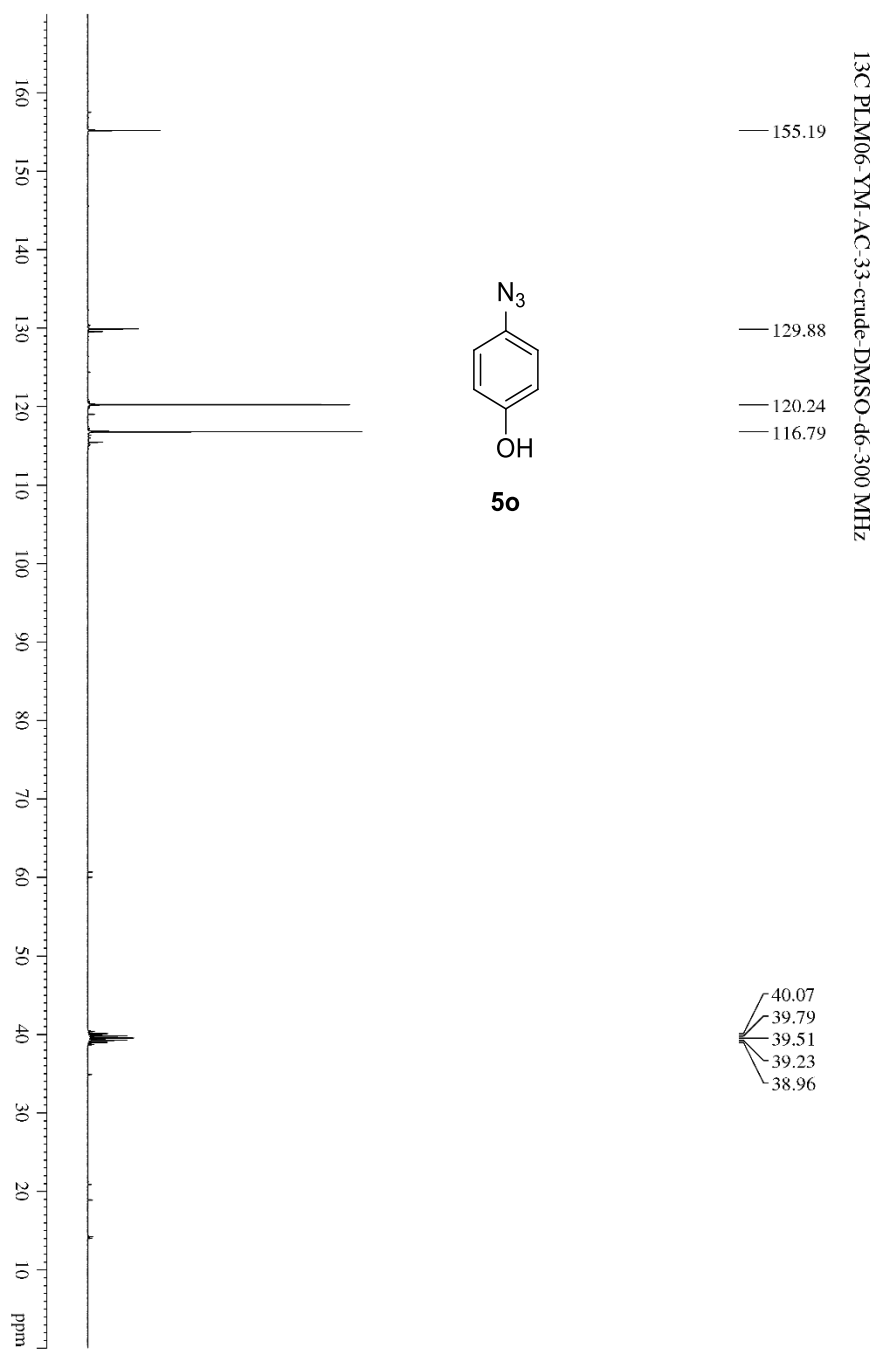


รูปภาพที่ 77 ¹H NMR สเปกตรัมของ 3-azidophenol (**5n**)

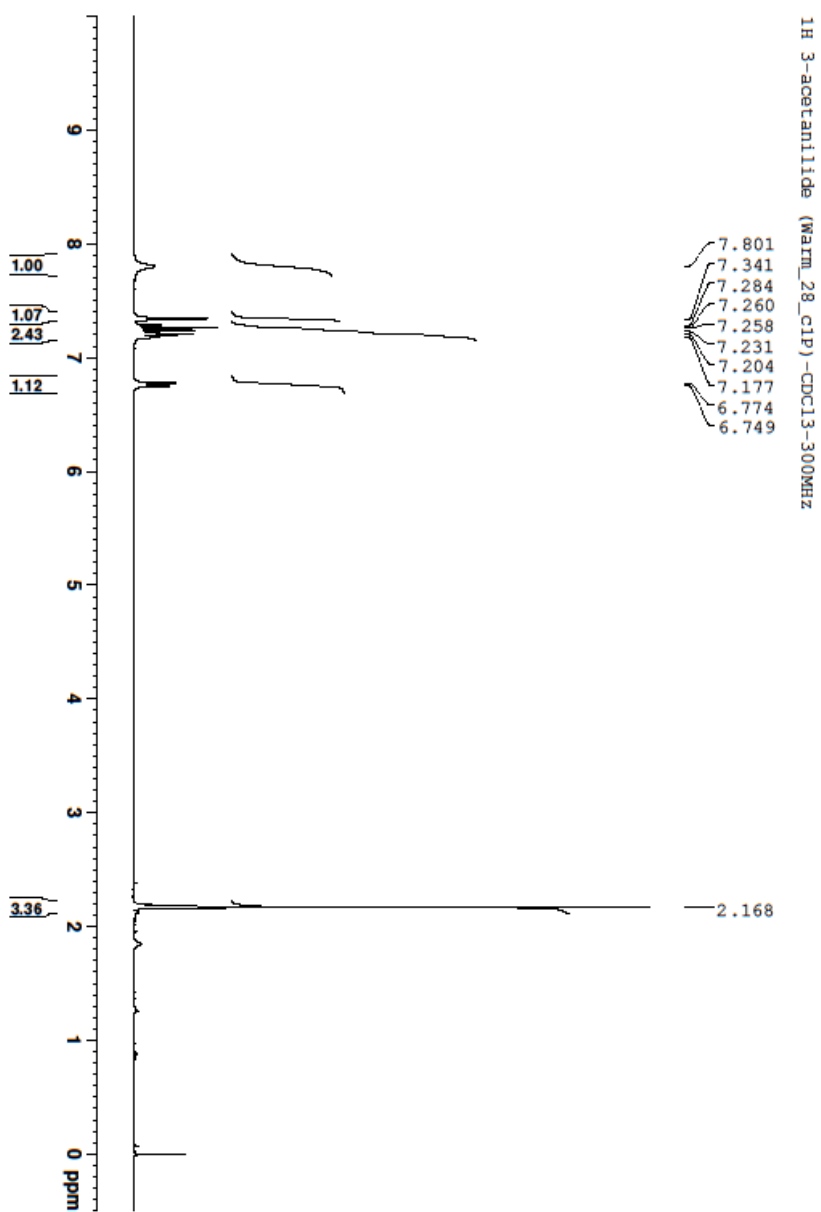
รูปภาพที่ 78 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 3-azidophenol (5n)



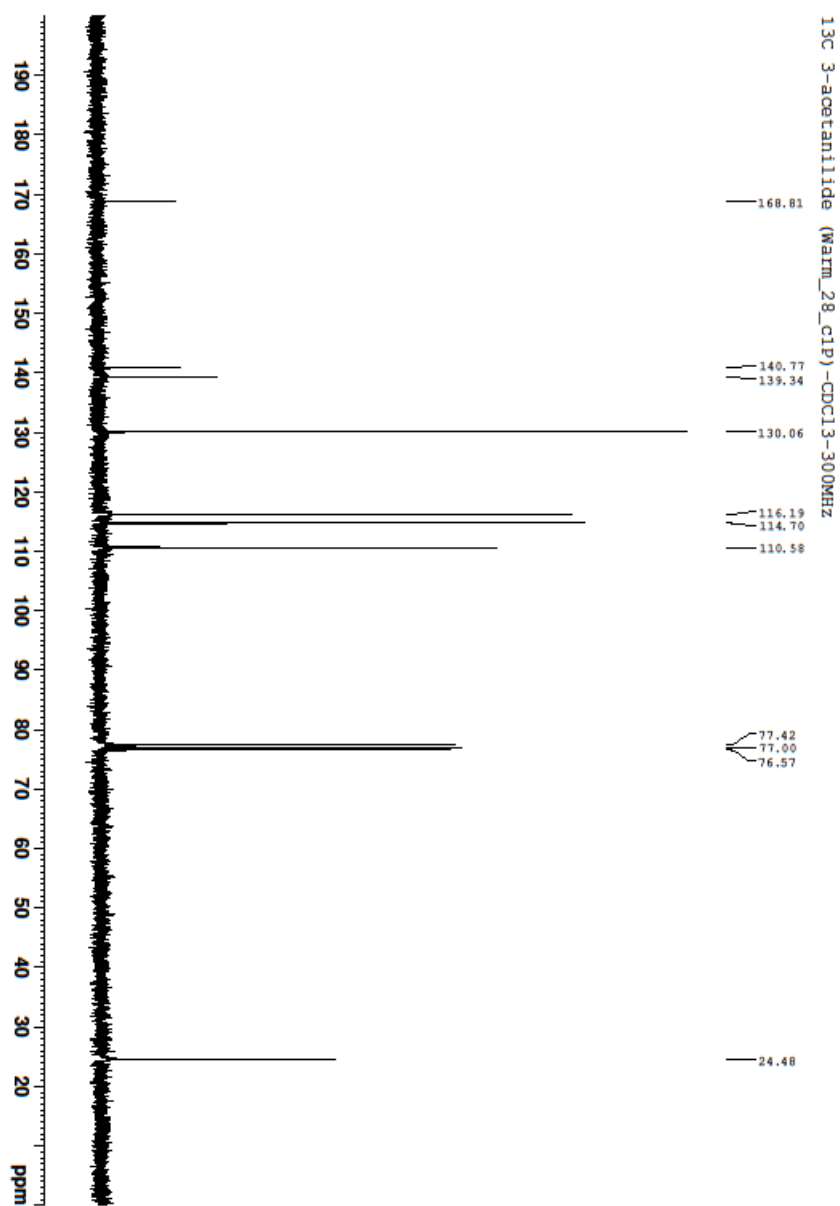
รูปภาพที่ 79 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4-Azidophenol (**5o**)



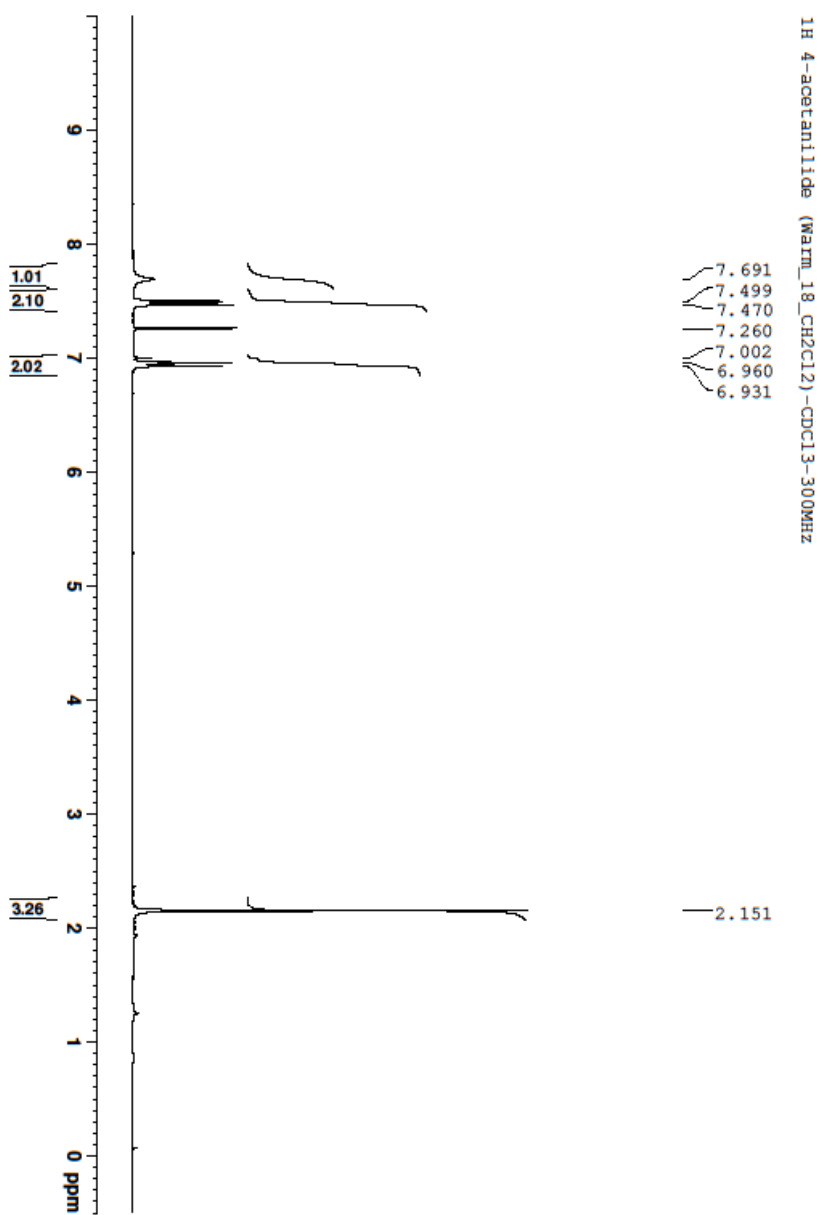
รูปภาพที่ 80 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4-Azidophenol (**5o**)



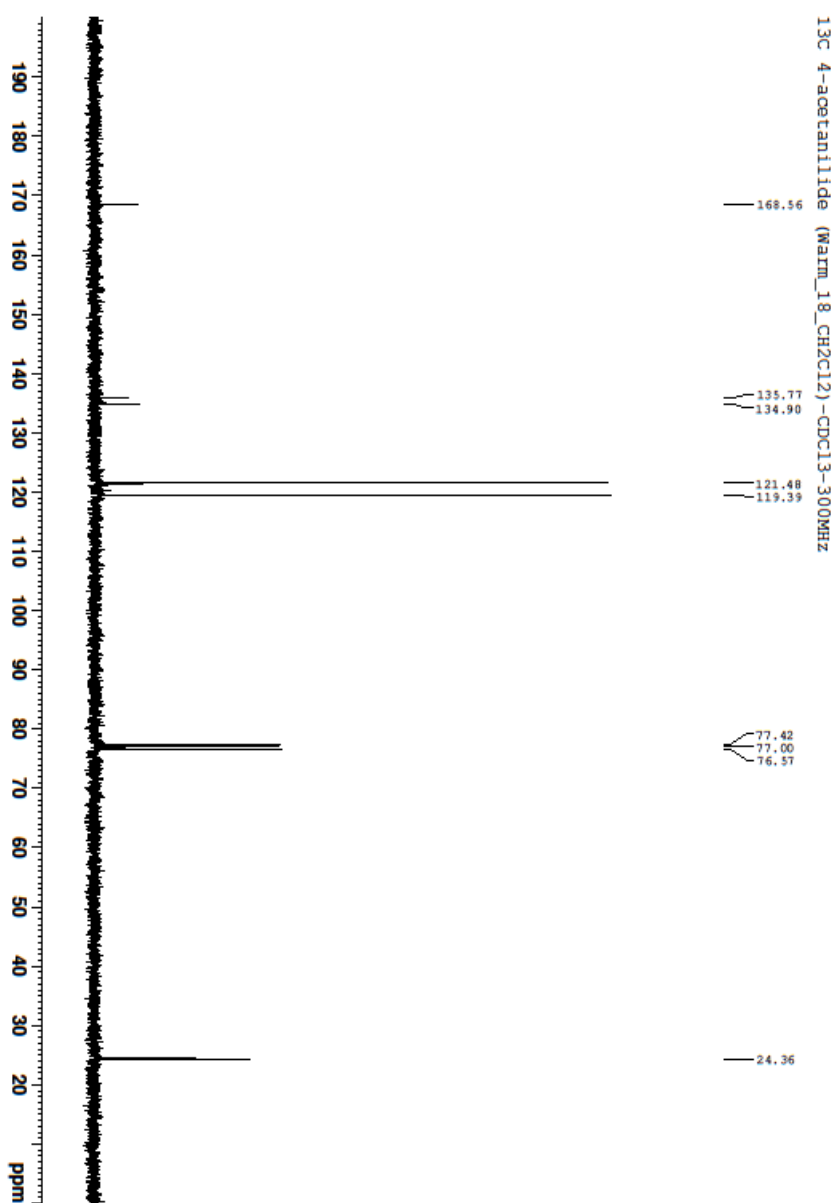
รูปภาพที่ 81 ^1H NMR สเปกตรัมของ N-(3-azidophenyl)acetamide (5p)



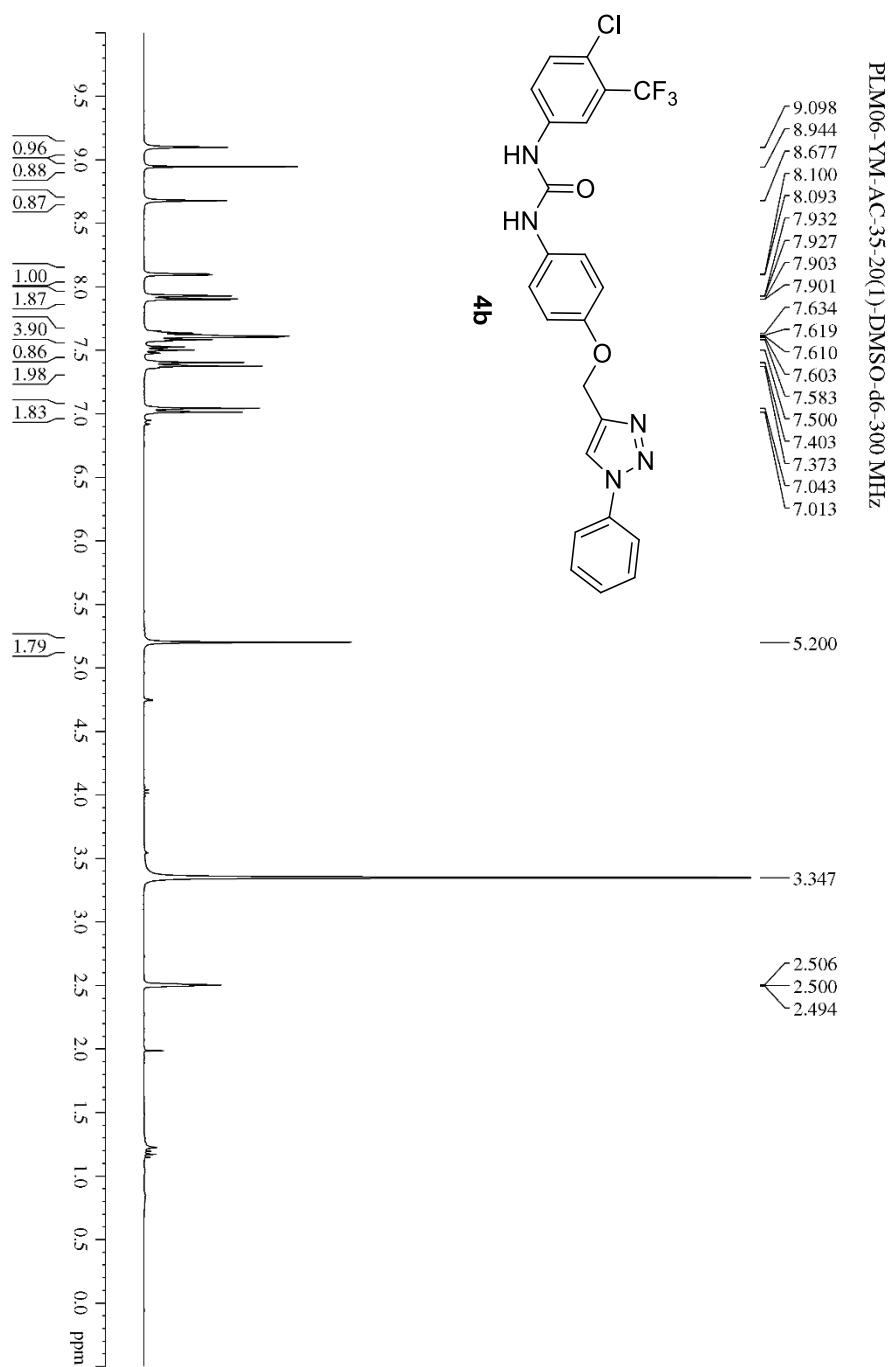
รูปภาพที่ 82 ¹³C NMR สเปกตรัมของ N-(3-azidophenyl)acetamide (5p)



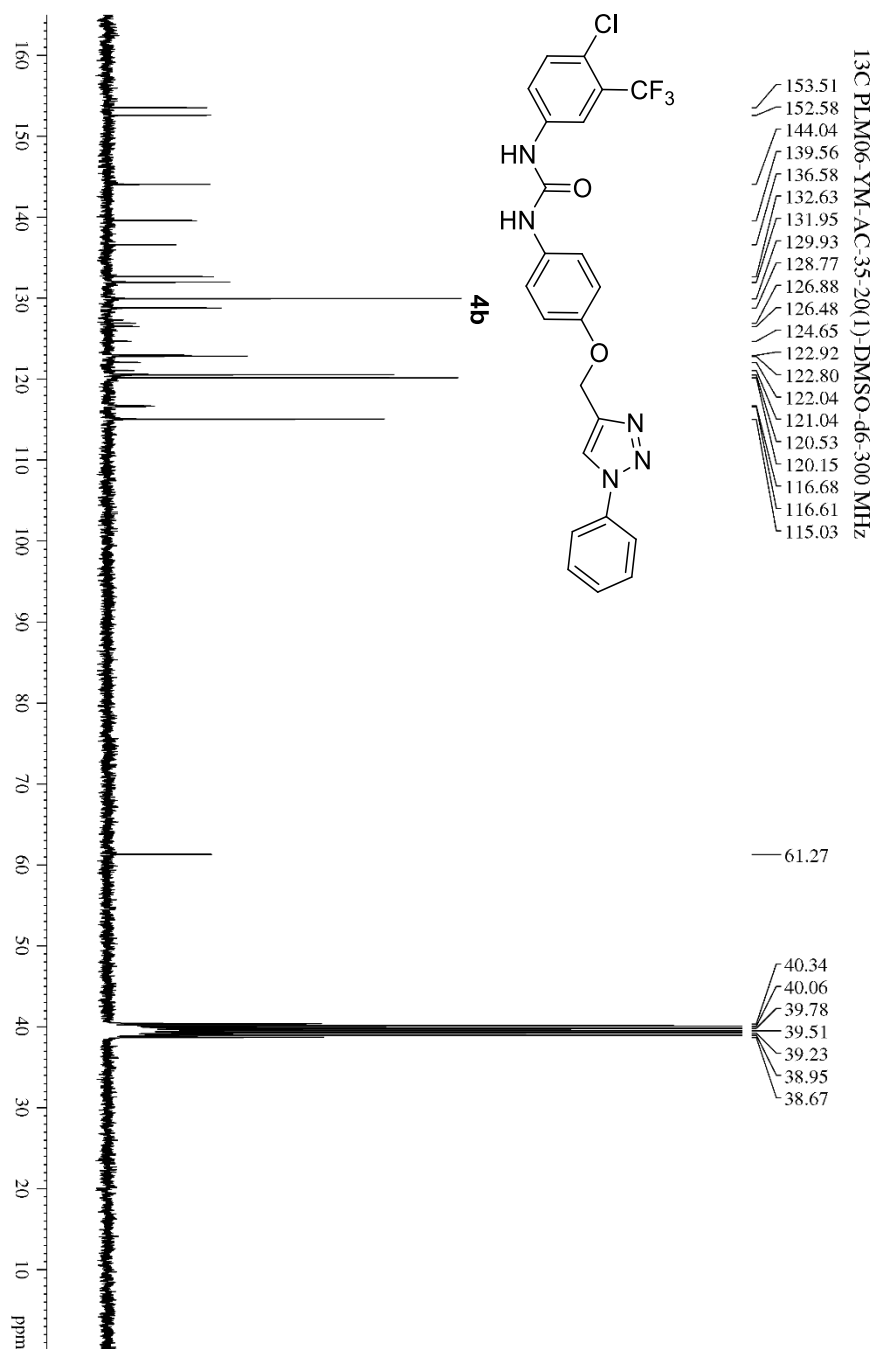
รูปภาพที่ 83 ^1H NMR สเปกตรัมของ N-(4-azidophenyl)acetamide (5q)



รูปภาพที่ 84 ¹³C NMR สเปกตรัมของ N-(4-azidophenyl)acetamide (5q)

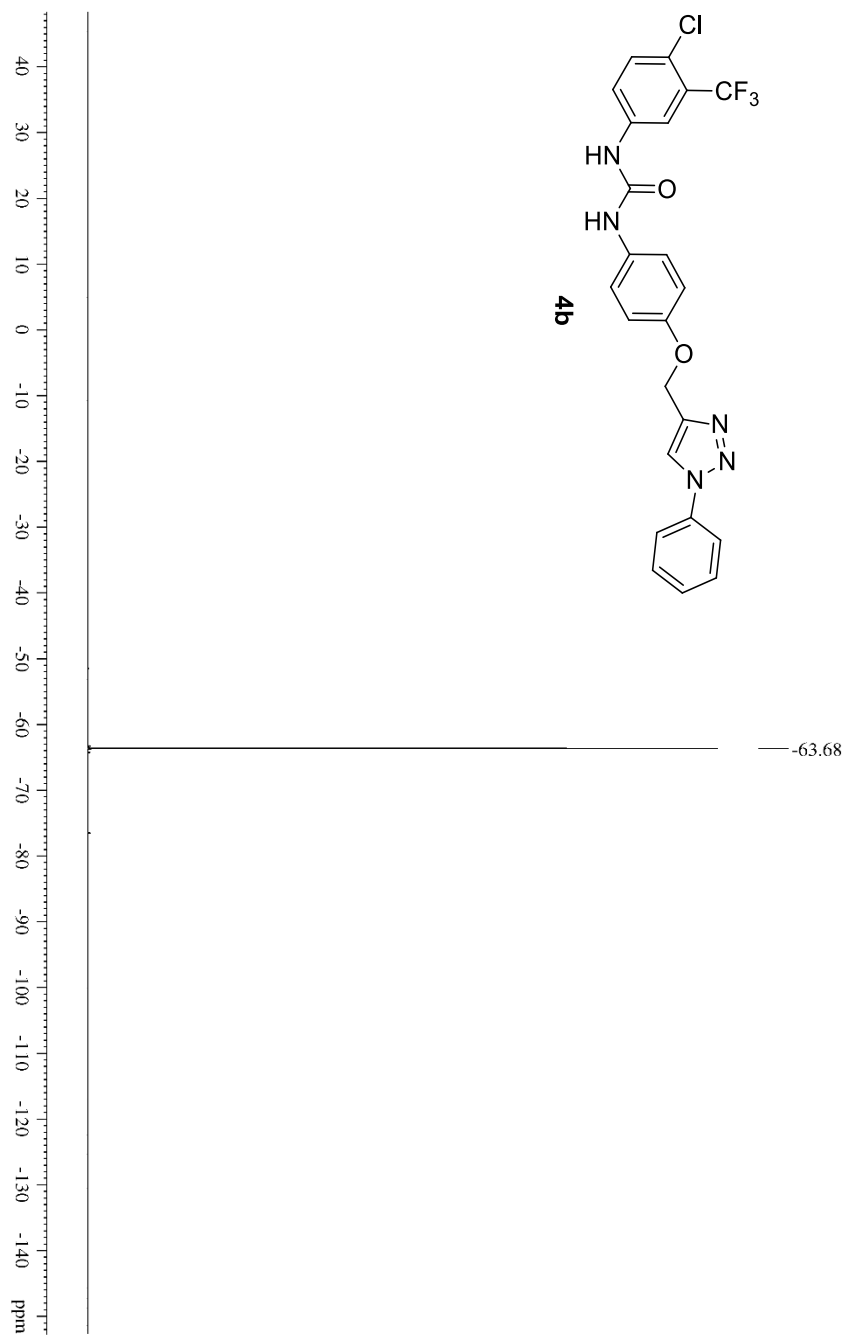


รูปภาพที่ 85 ^1H NMR สเปกตรัมของ **4b**



รูปภาพที่ 86 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4b

¹⁹F PLM06-YM-AC-35-20(1)-DMSO-d₆-300 MHz



รูปภาพที่ 87 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4b

BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

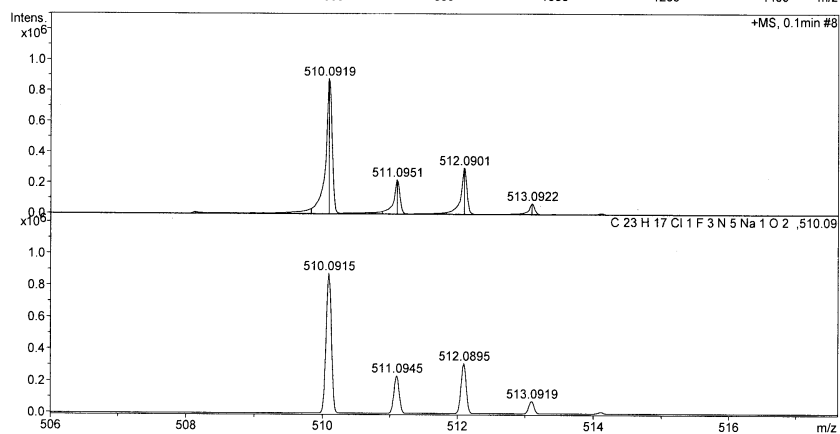
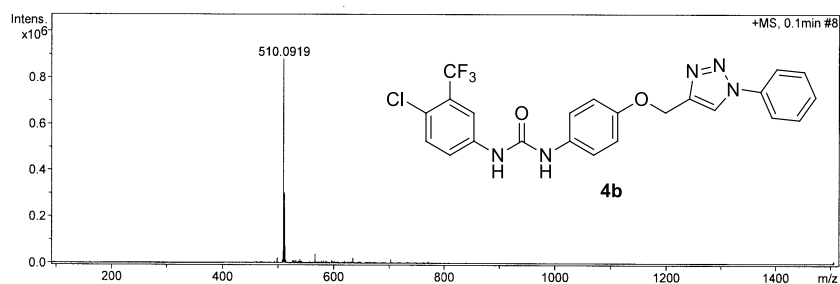
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\p 4H.d
Method NaFormate_pos.m
Sample Name P 4 H

Acquisition Date 7/25/2017 11:37:58 AM

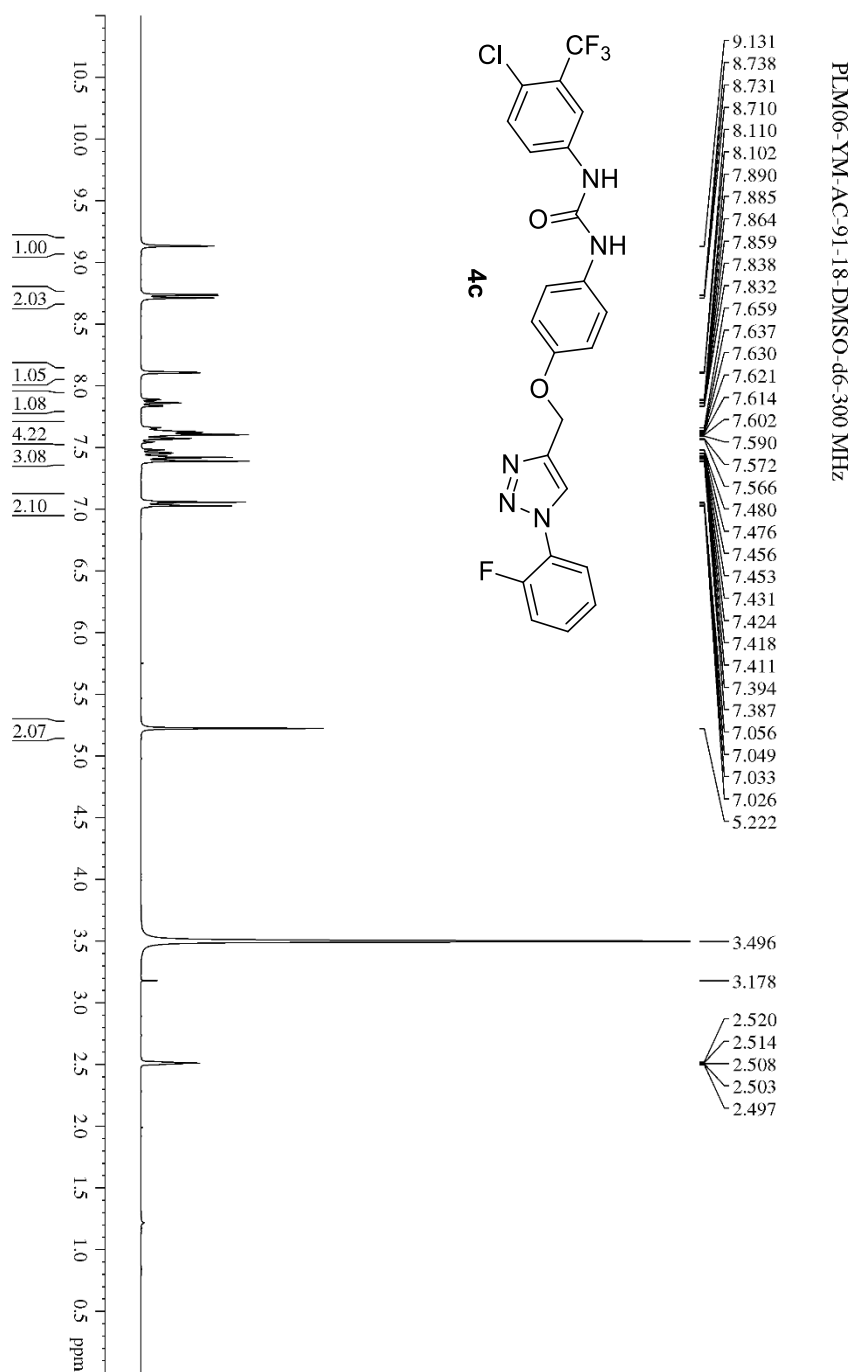
Operator Stuchai Ext: 3560
Instrument micrOTOF Bruker
Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

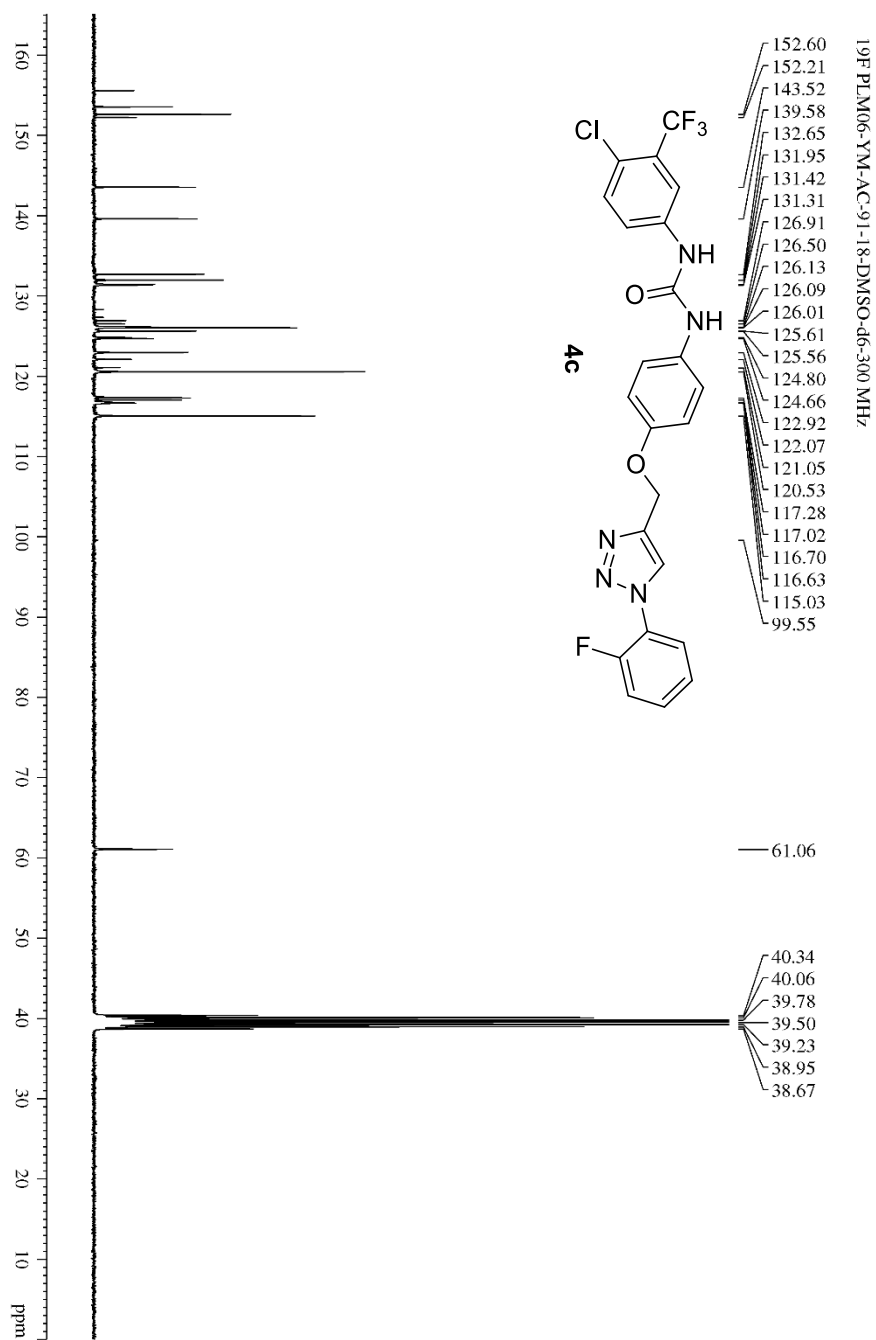
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



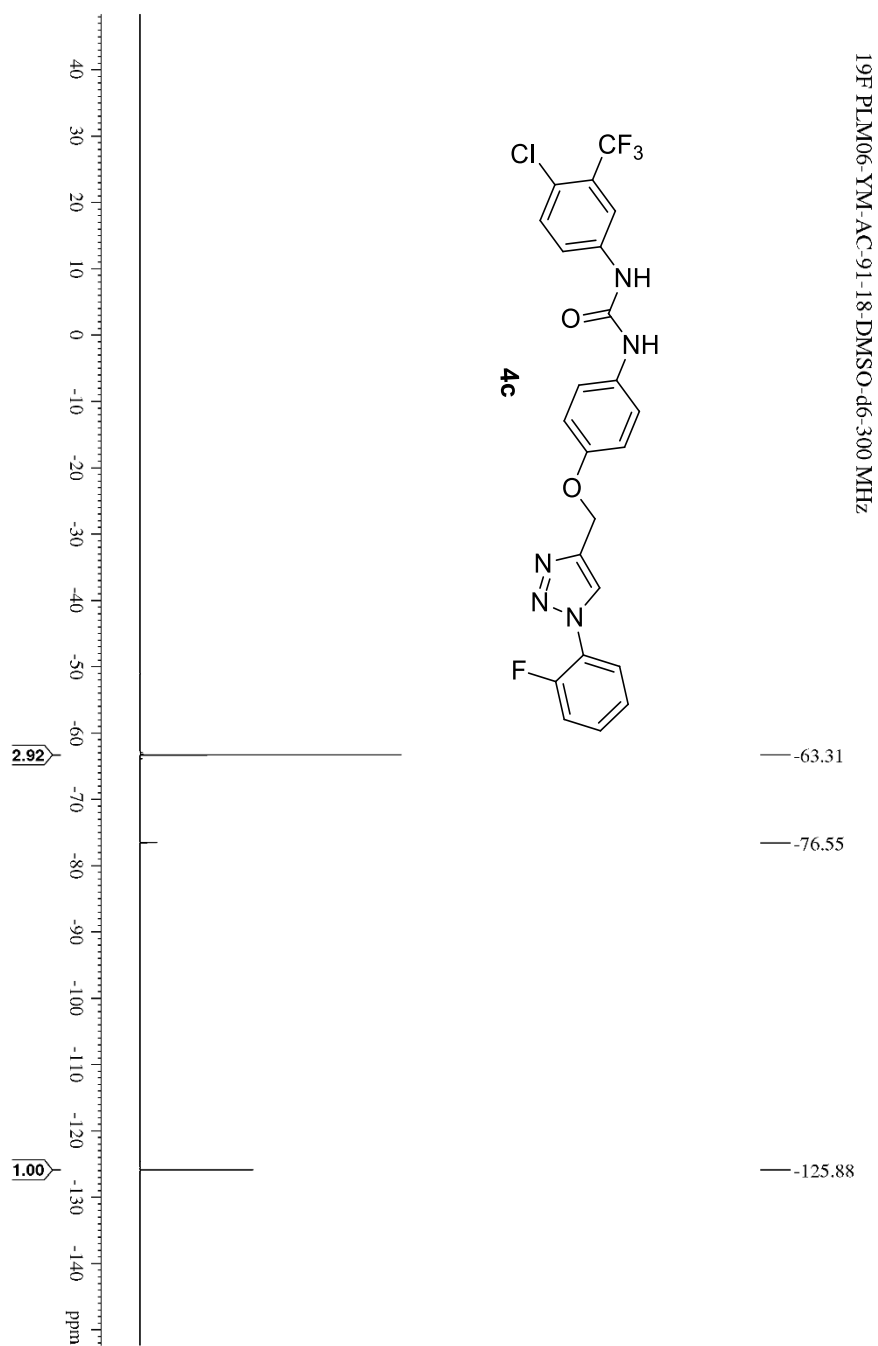
รูปภาพที่ 88 MS สเปกตรัมของ 4b



รูปภาพที่ 89 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4c



รูปภาพที่ 90 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ **4c**

รูปภาพที่ 91 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4c

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

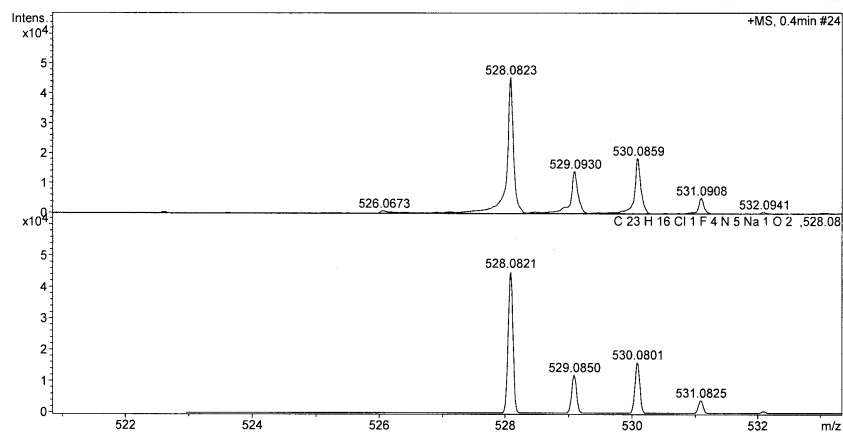
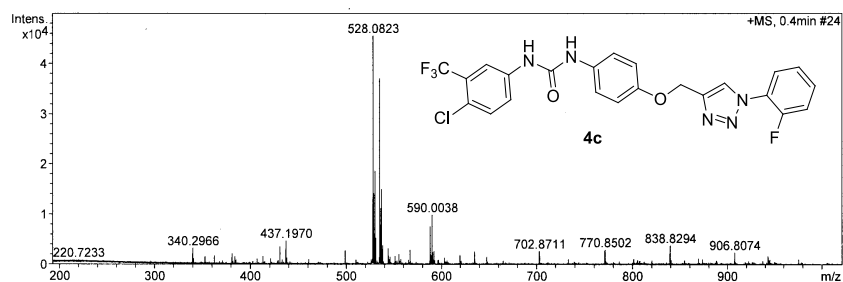
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\IP 2F.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name P 2F

Acquisition Date 7/25/2017 12:39:53 PM

Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

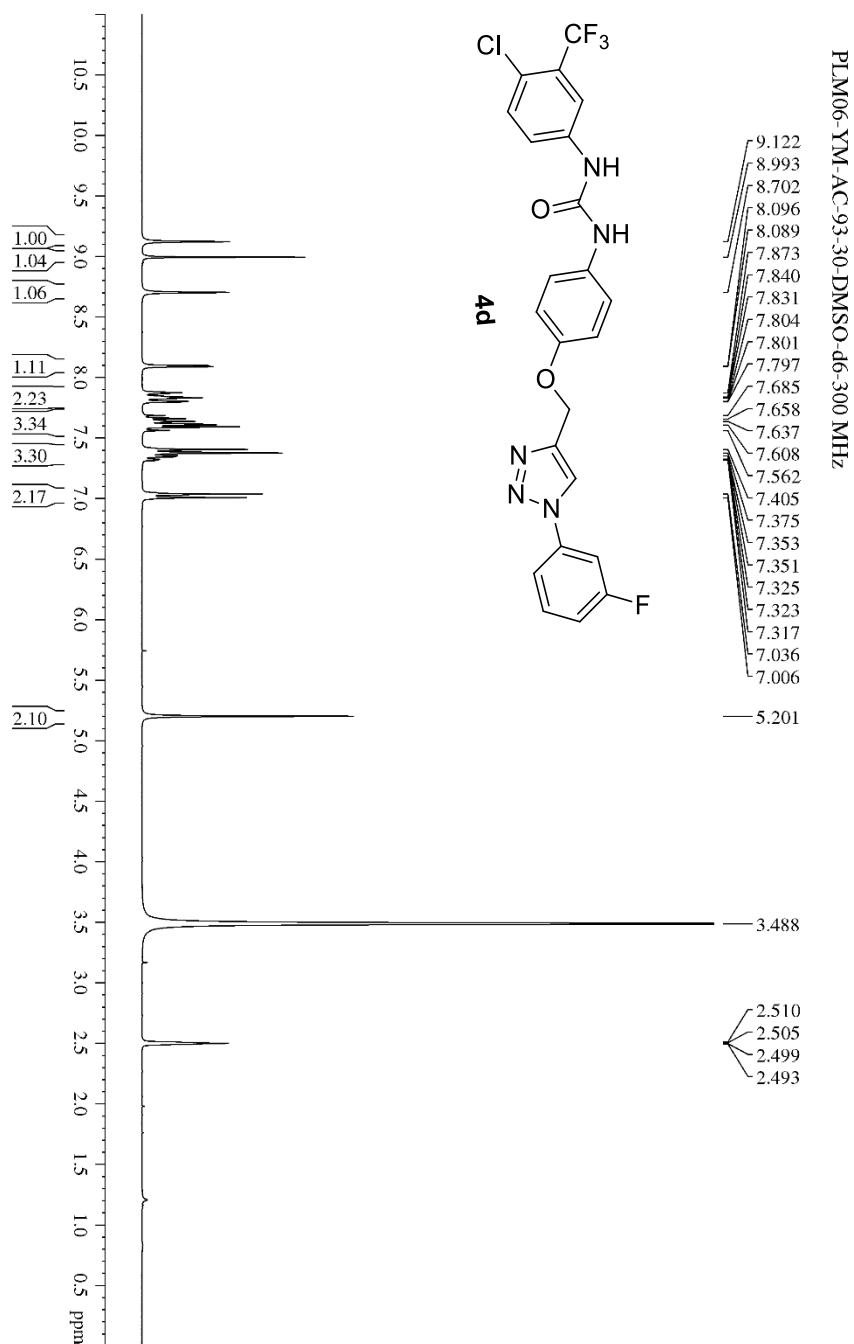


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

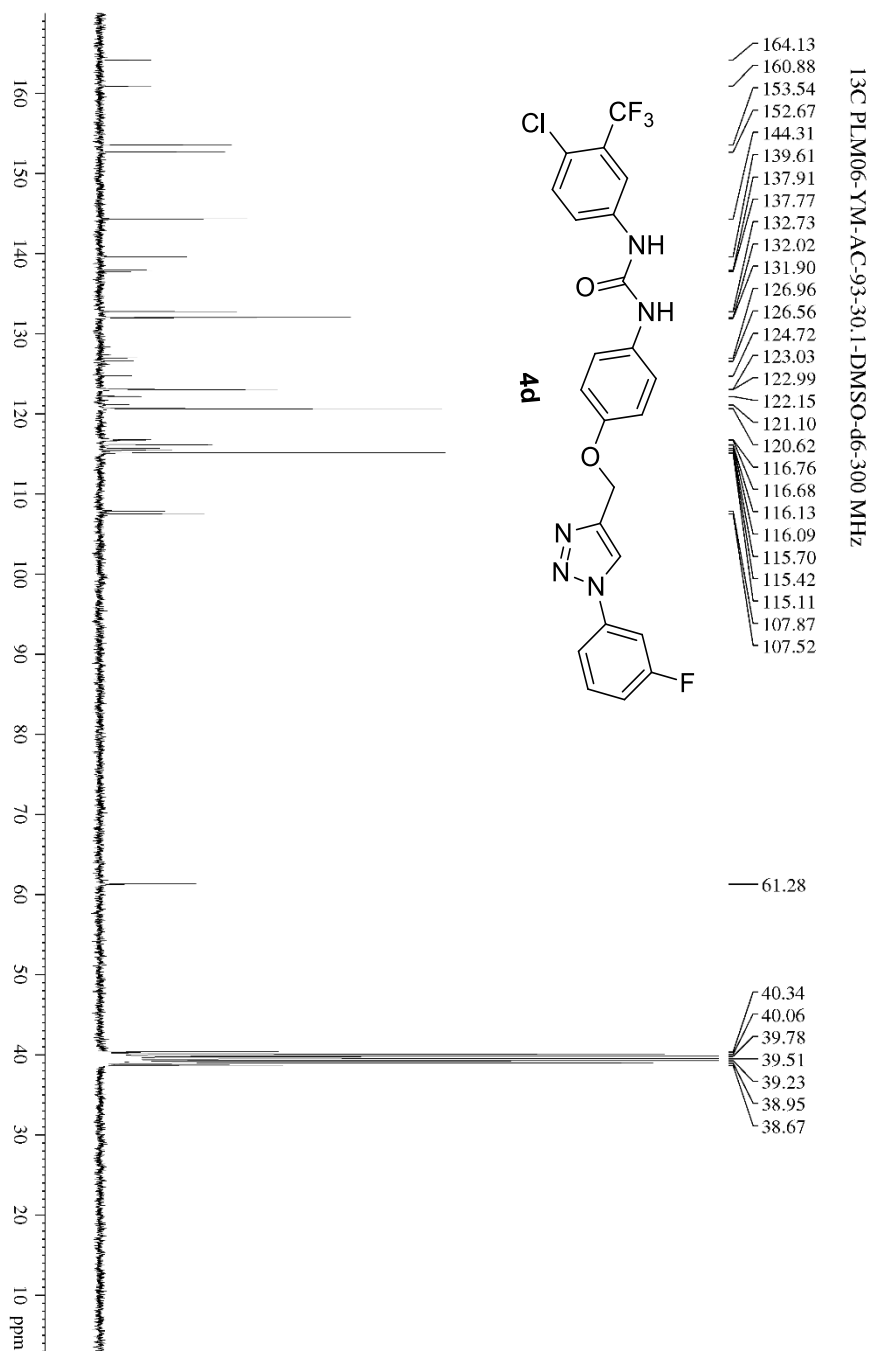
printed: 7/27/2017 9:25:03 AM

Page 1 of 1

รูปภาพที่ 92 MS สเปกตรัมของ 4c

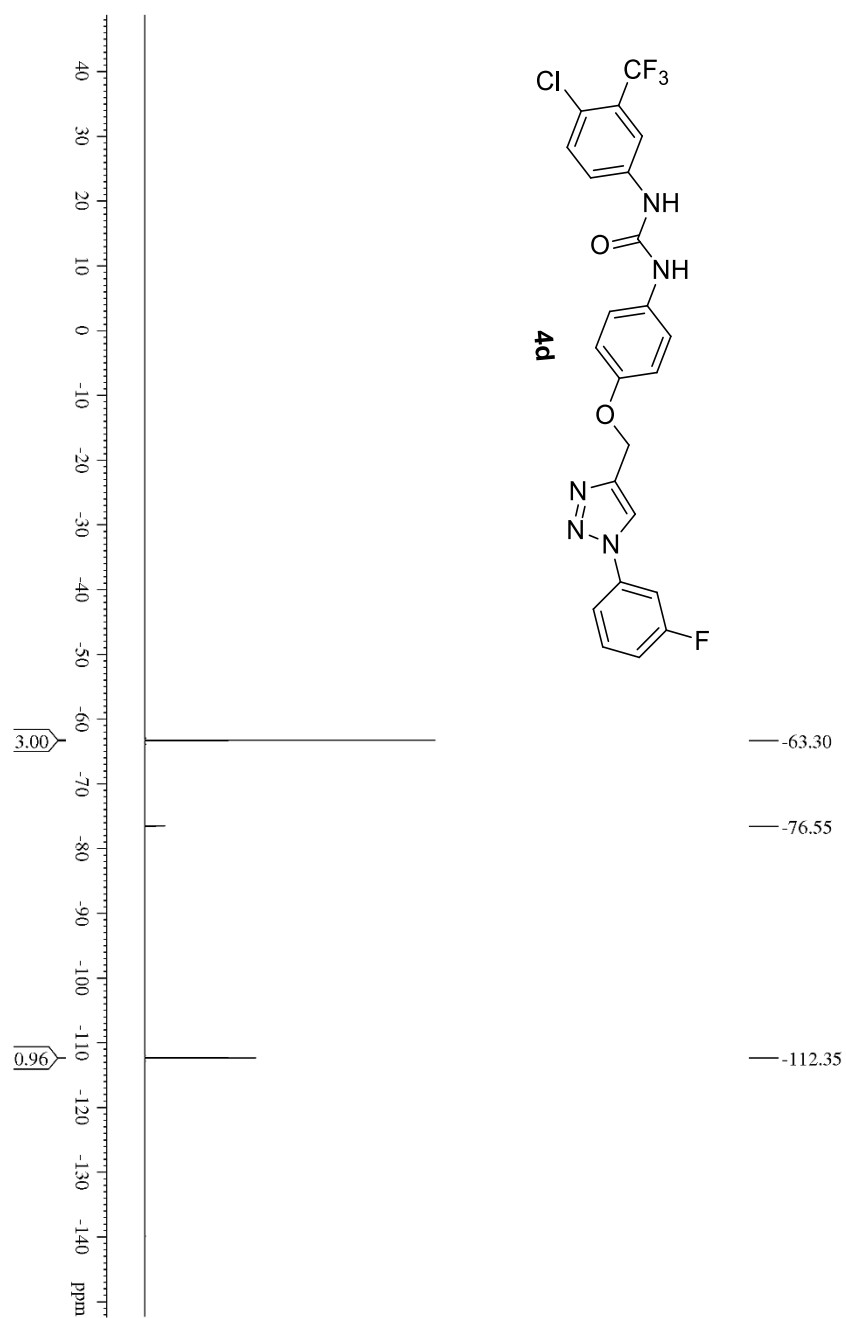


รูปภาพที่ 93 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4d



รูปภาพที่ 94 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 4d

19F PLM06-YM-AC-93-30-DMSO-d6-300 MHz

รูปภาพที่ 95 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4d

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

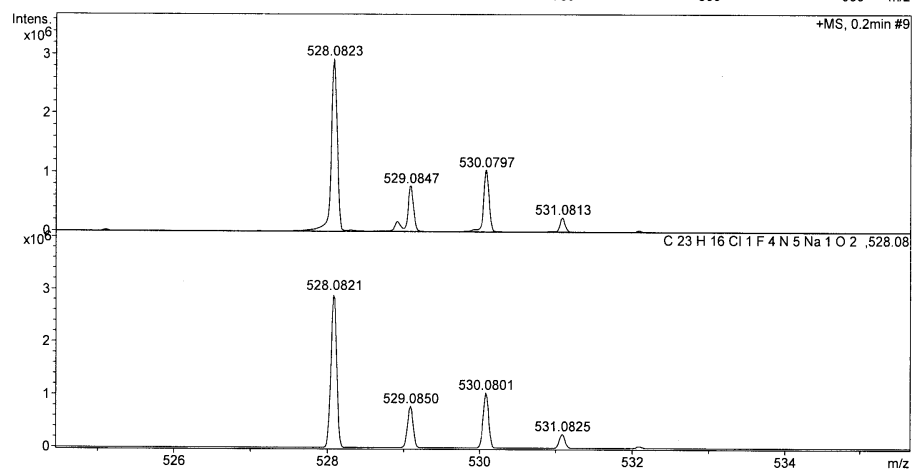
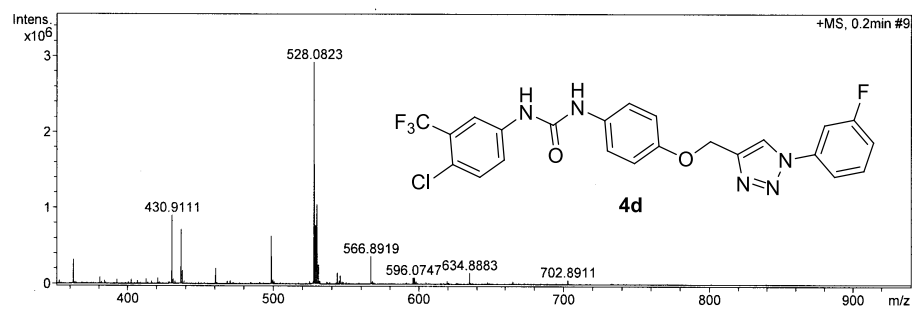
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\IP 3F.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name P 3F

Acquisition Date 7/25/2017 10:55:17 AM

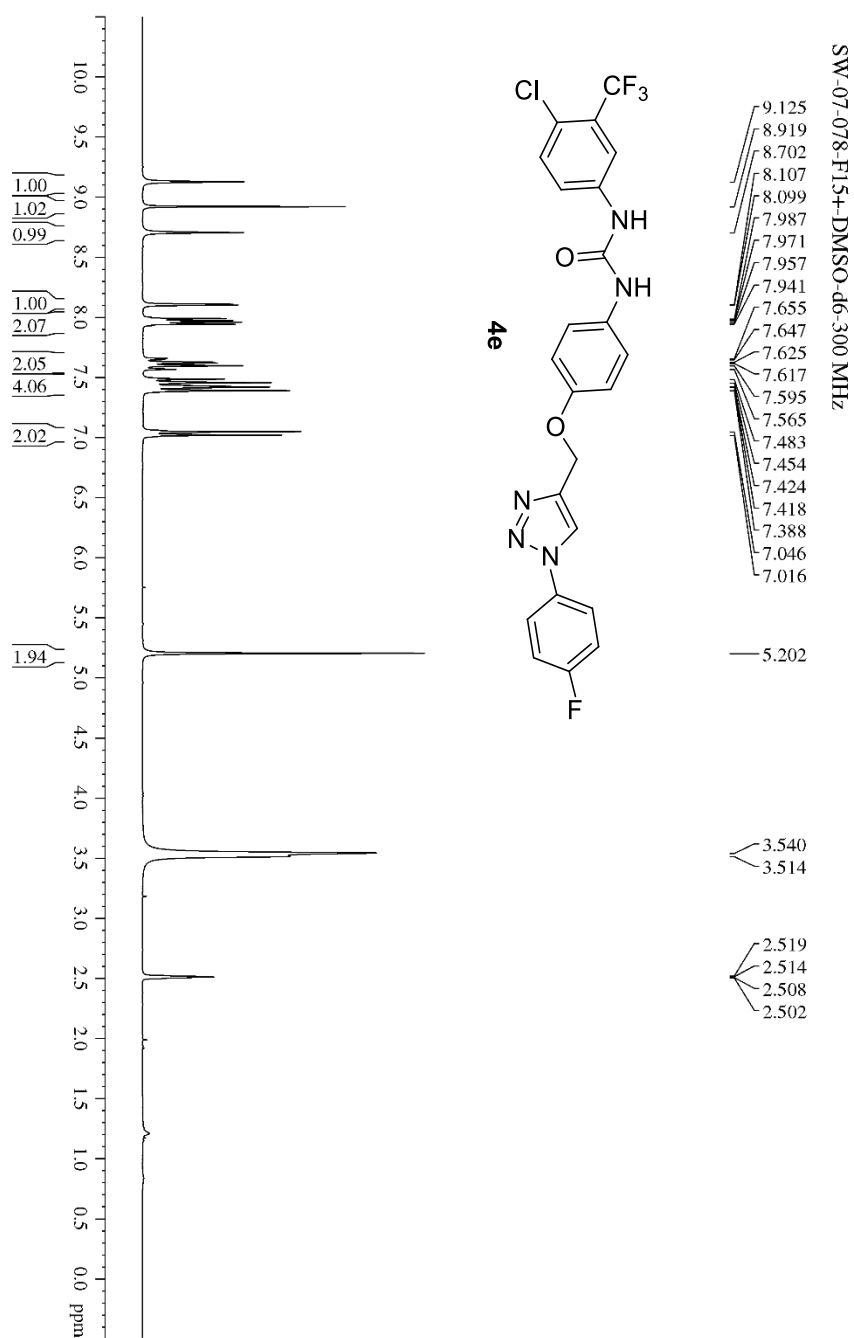
Operator Stuchai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

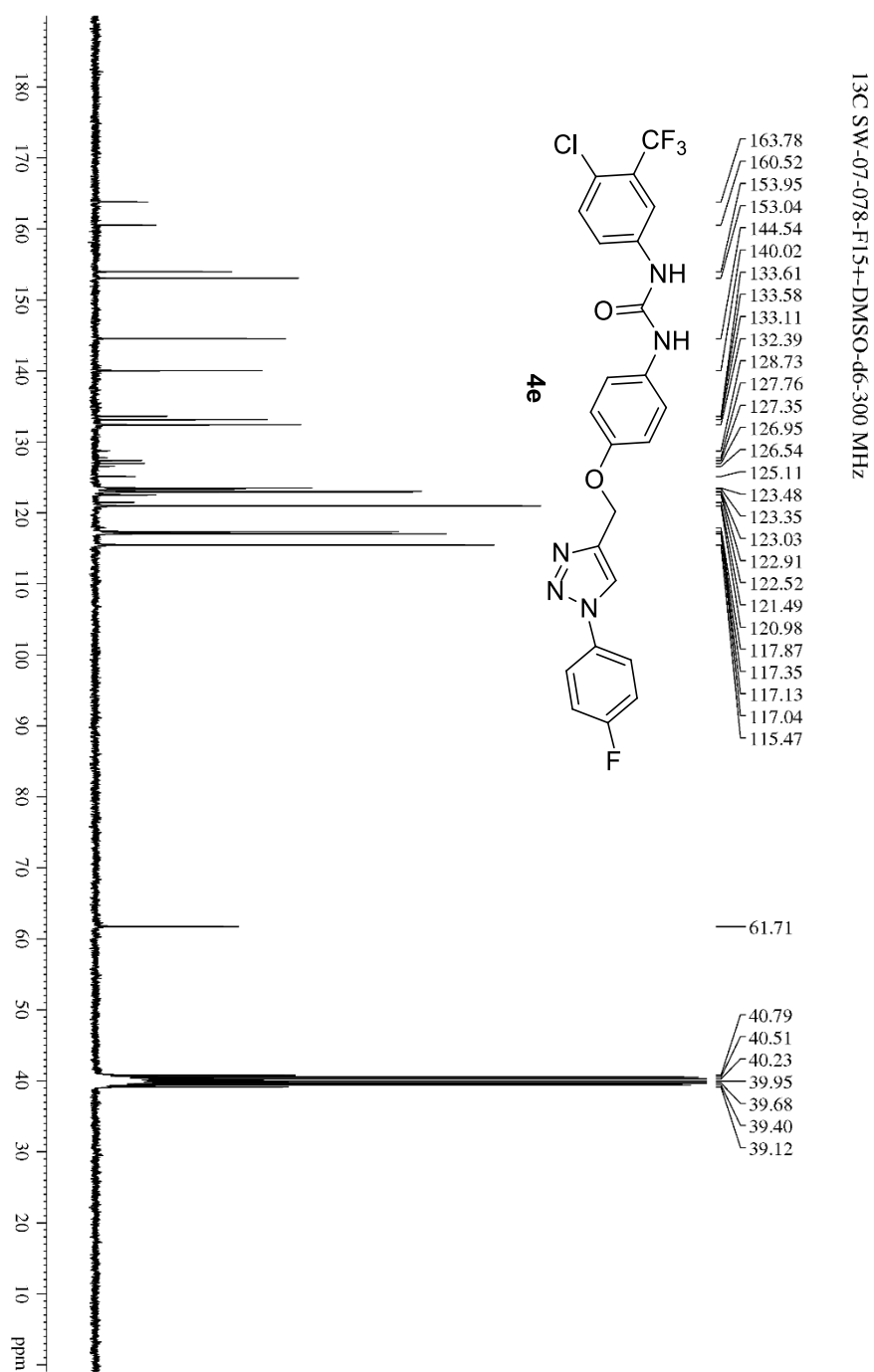
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

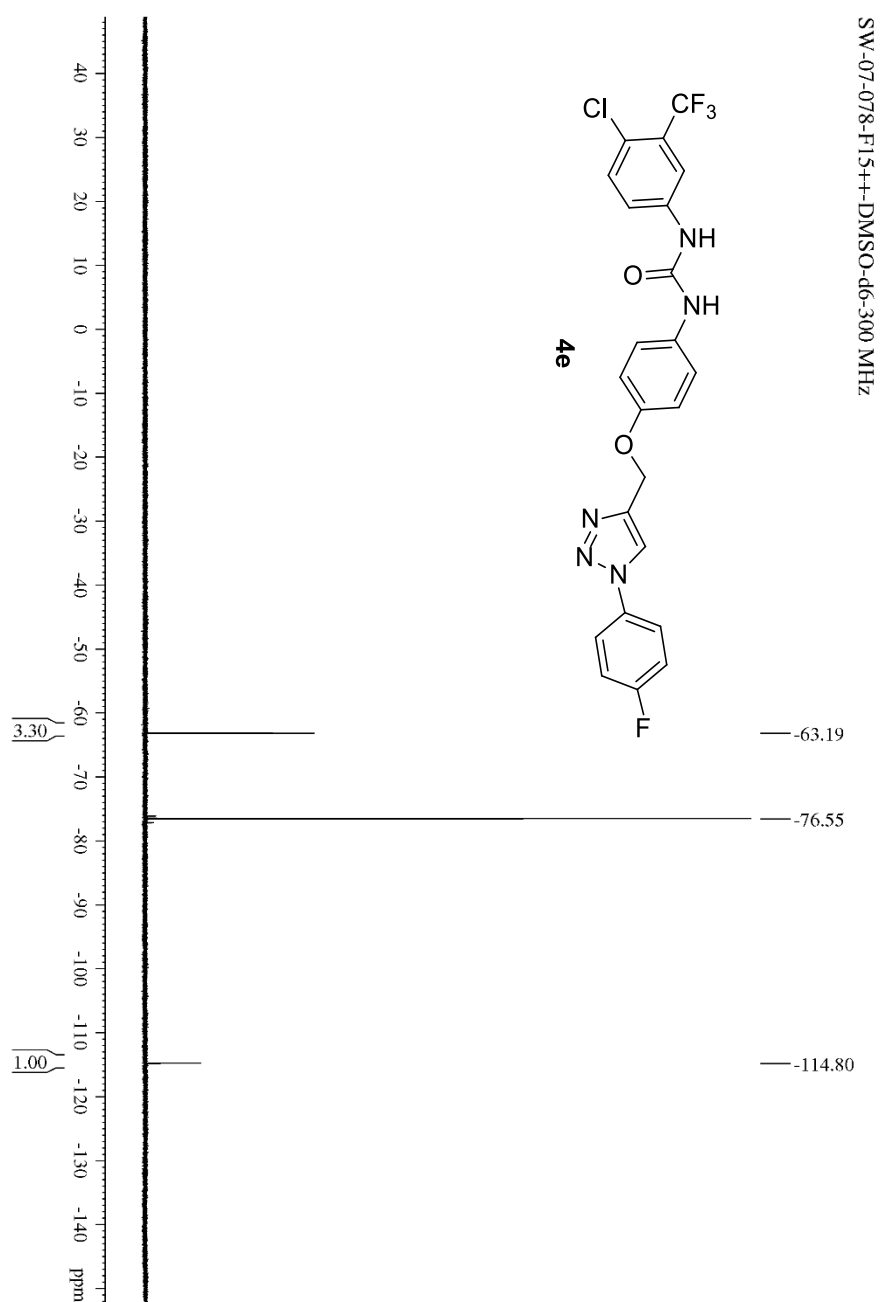


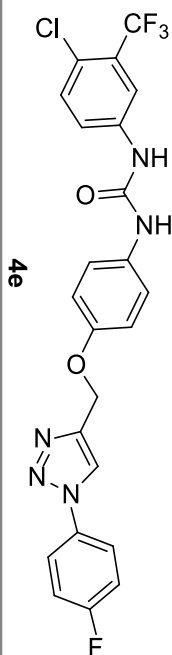
รูปภาพที่ 96 MS สเปกตรัมของ 4d



รูปภาพที่ 97 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4e

รูปภาพที่ 98 ¹³C NMR สเปกตรัมของ **4e**

รูปภาพที่ 99 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4e



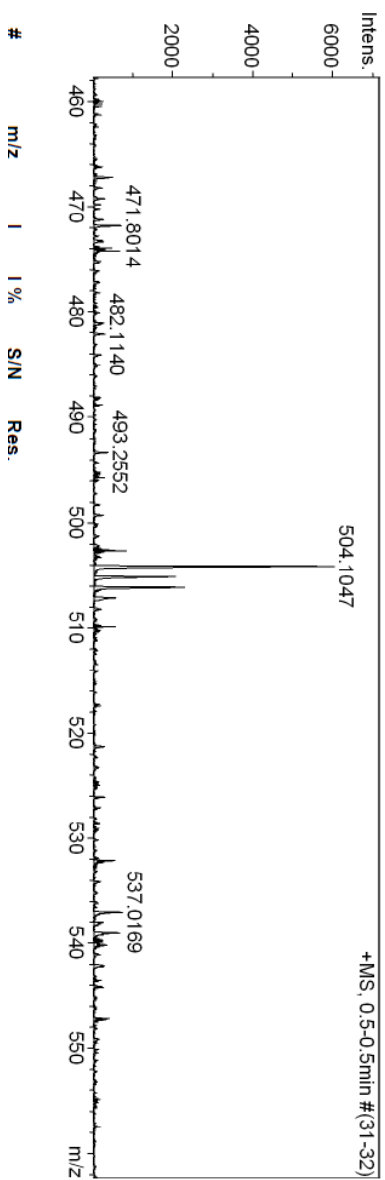
Mass Spectrum List Report

Analysis Info

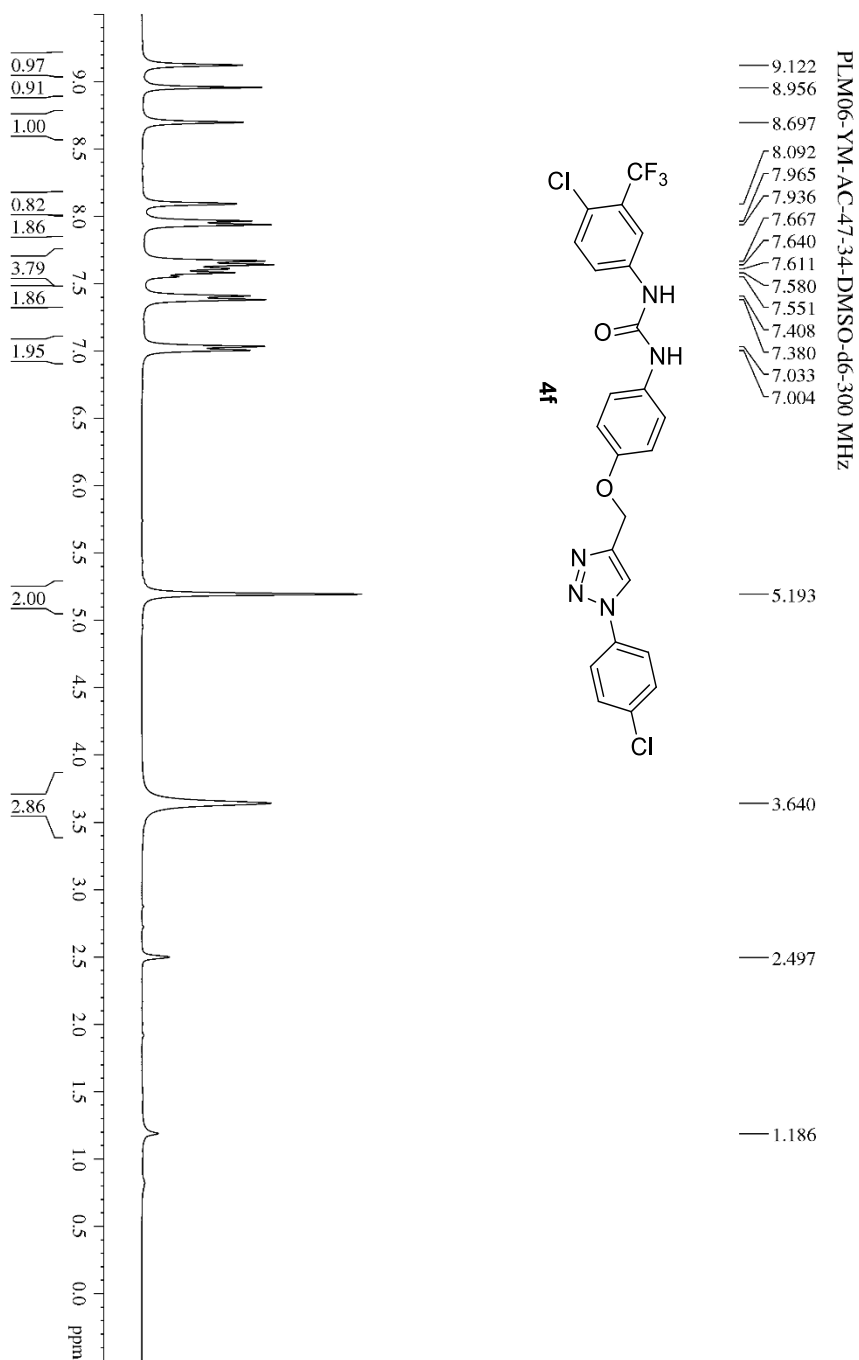
Analysis Name OSSSU05032019004_2.d Acquisition Date 3/5/2019 2:34:48 PM
 Method Tune_low_POS_2019.m Operator Administrator
 Sample Name 24 Instrument micrOTOF 72
 05022019

Acquisition Parameter

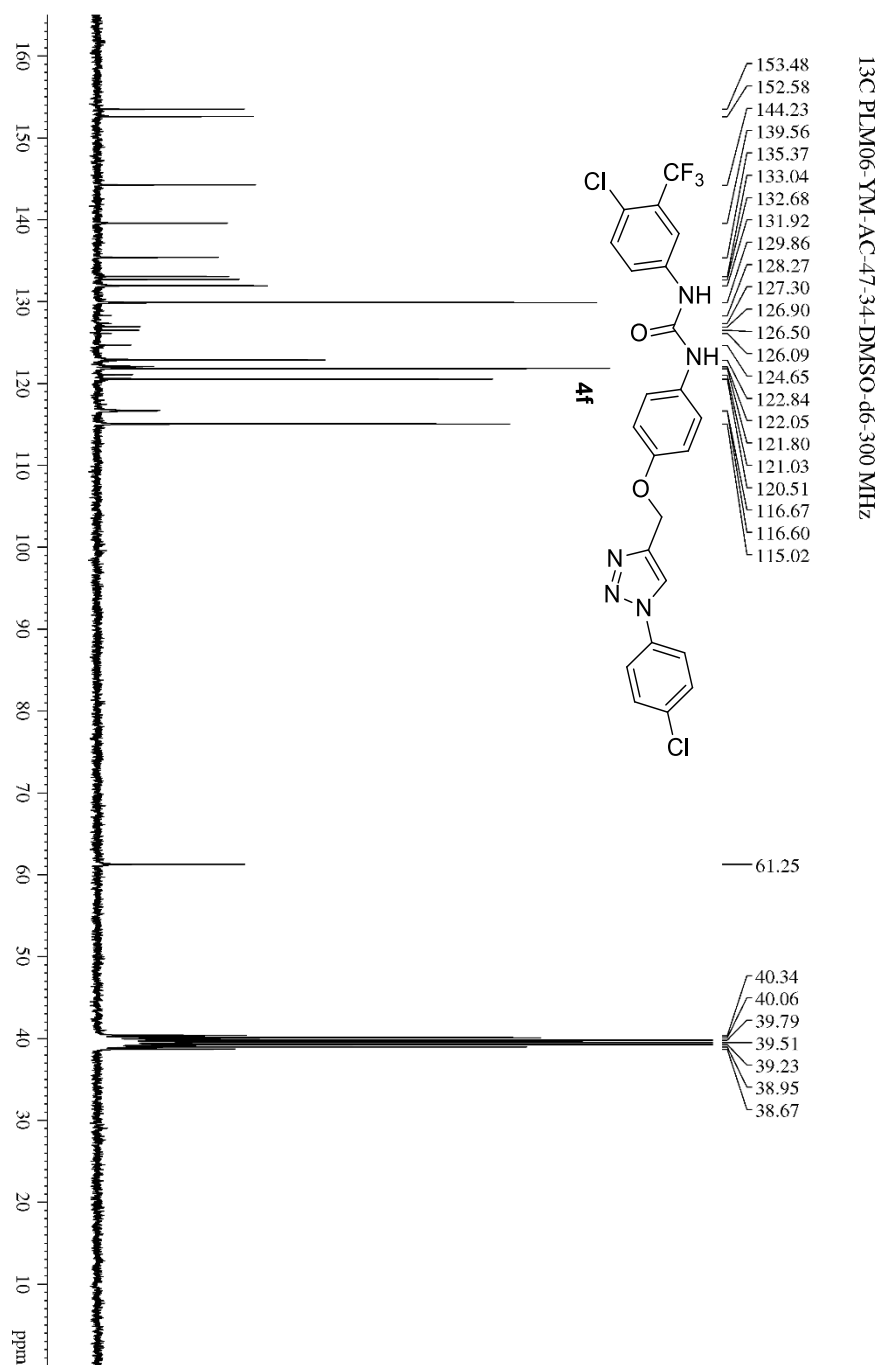
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Scan Range	n/a	Capillary Exit	130.0 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	150.0 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.0 V
		Hexapole 1	24.3 V
		Set Corrector Fill	50 V
		Set Pulsar Pull	337 V
		Set Pulsar Push	337 V
		Set Reflector	1300 V
		Set Flight Tube	9000 V
		Set Detector TOF	2295 V



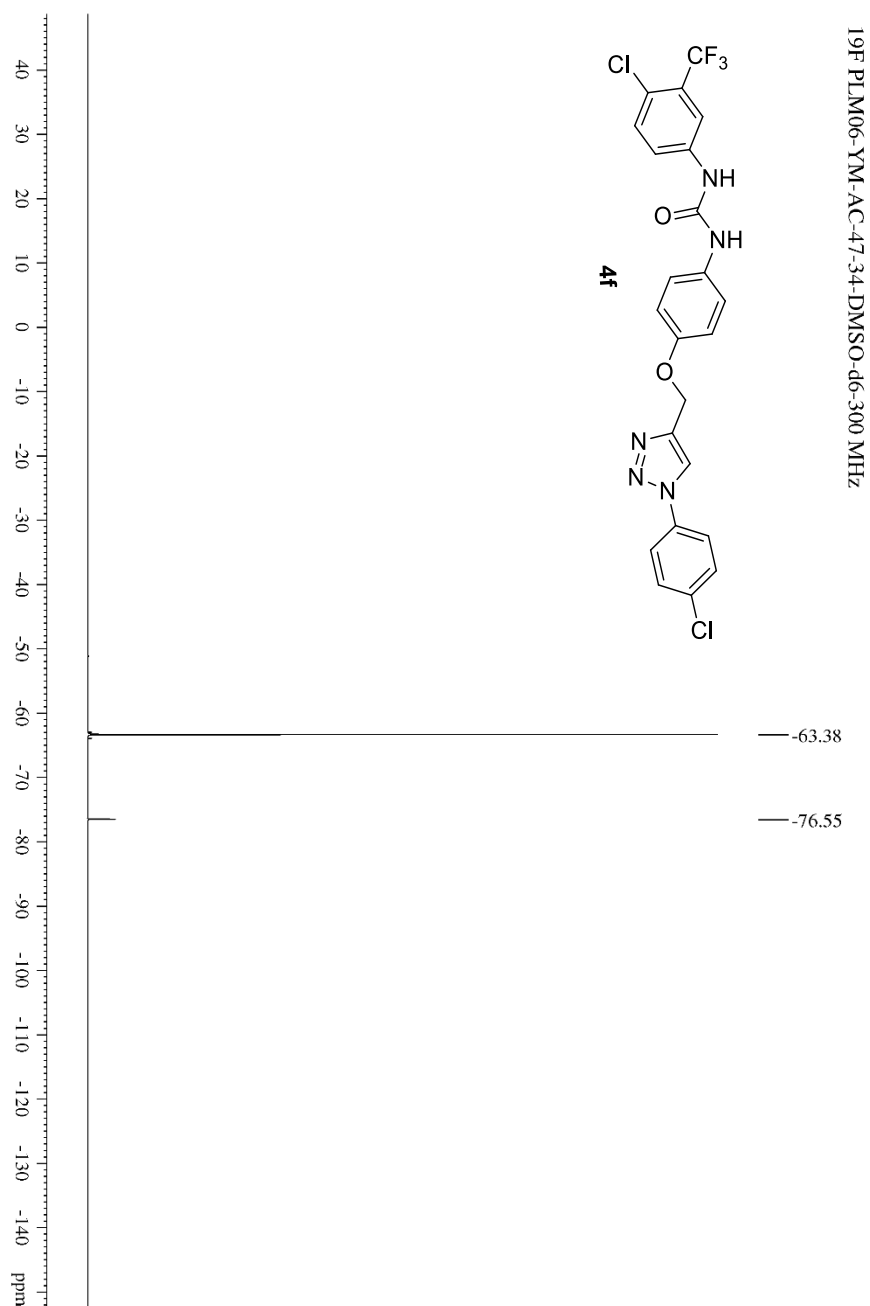
รูปภาพที่ 100 MS สเปกตรัมของ 4e



รูปภาพที่ 101 ¹H NMR สเปกตรัมของ **4f**



รูปภาพที่ 102 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4f

รูปภาพที่ 103 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4f

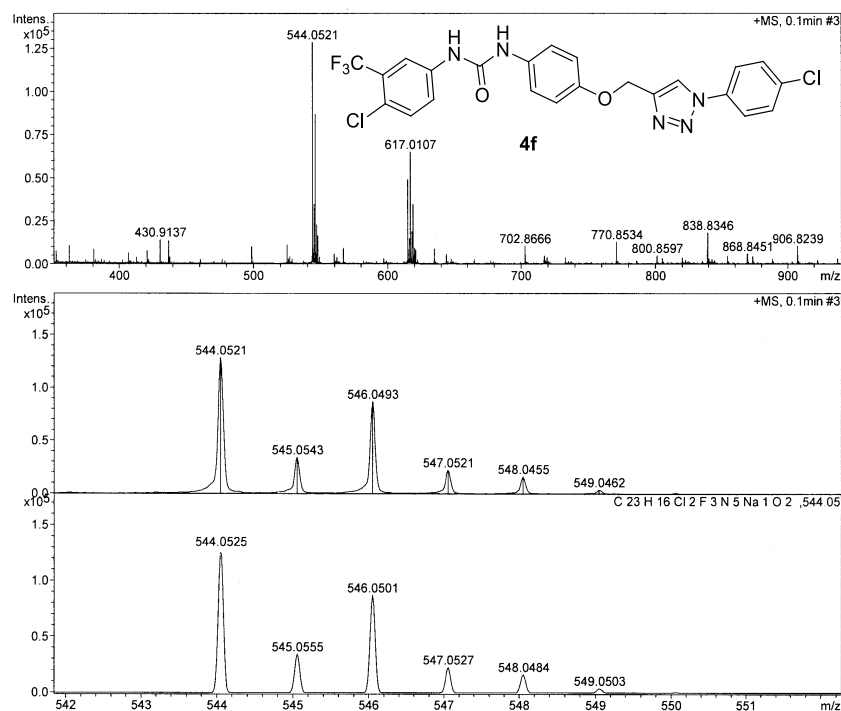
 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

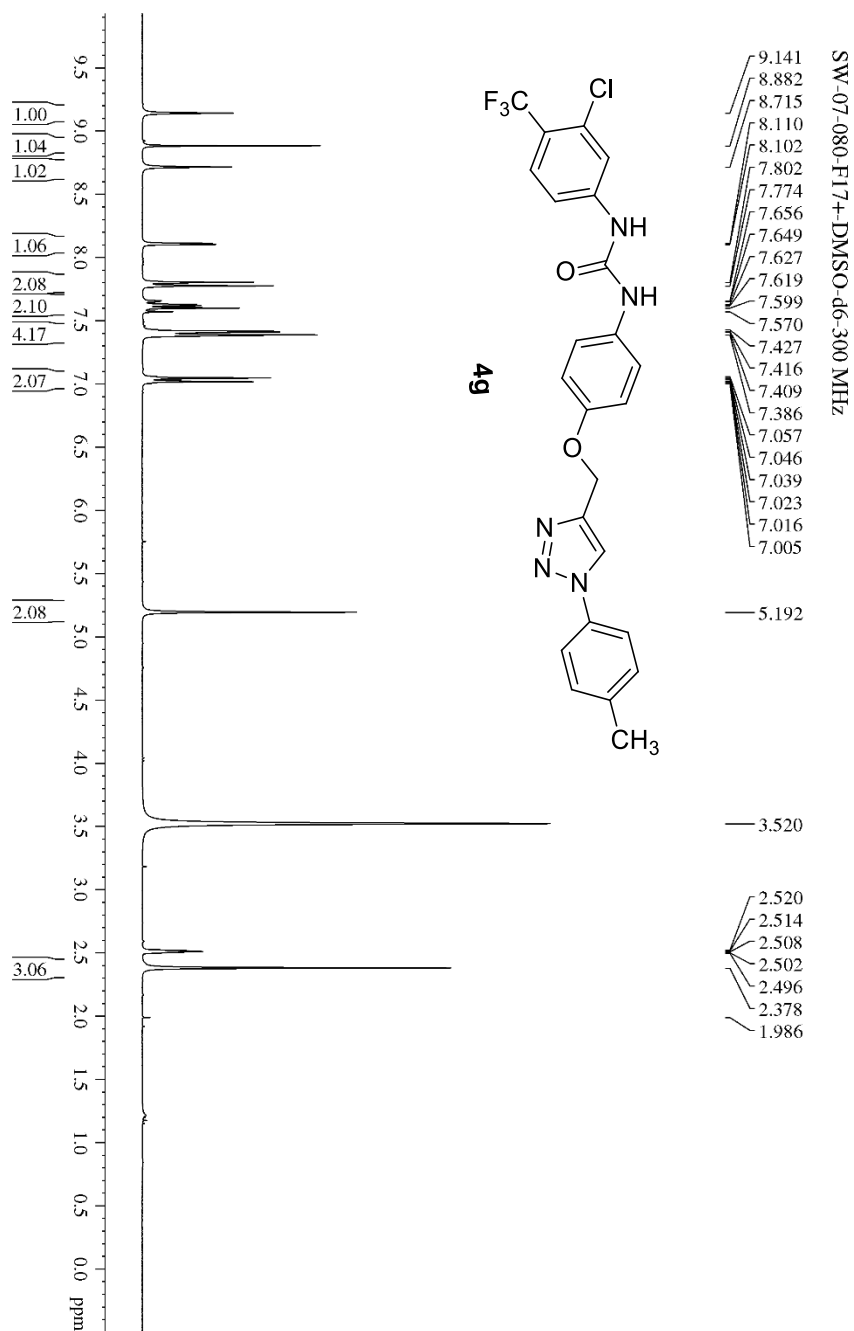
Analysis Name	C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\P 4Cl.d	Acquisition Date	7/25/2017 10:39:53 AM	
Method	NaFormate_pos.m	Operator	Stuichai	Ext: 3560
Sample Name	P 4Cl	Instrument	micrOTOF	Bruker
		Calibrate by	Sodium Formate	

Acquisition Parameter

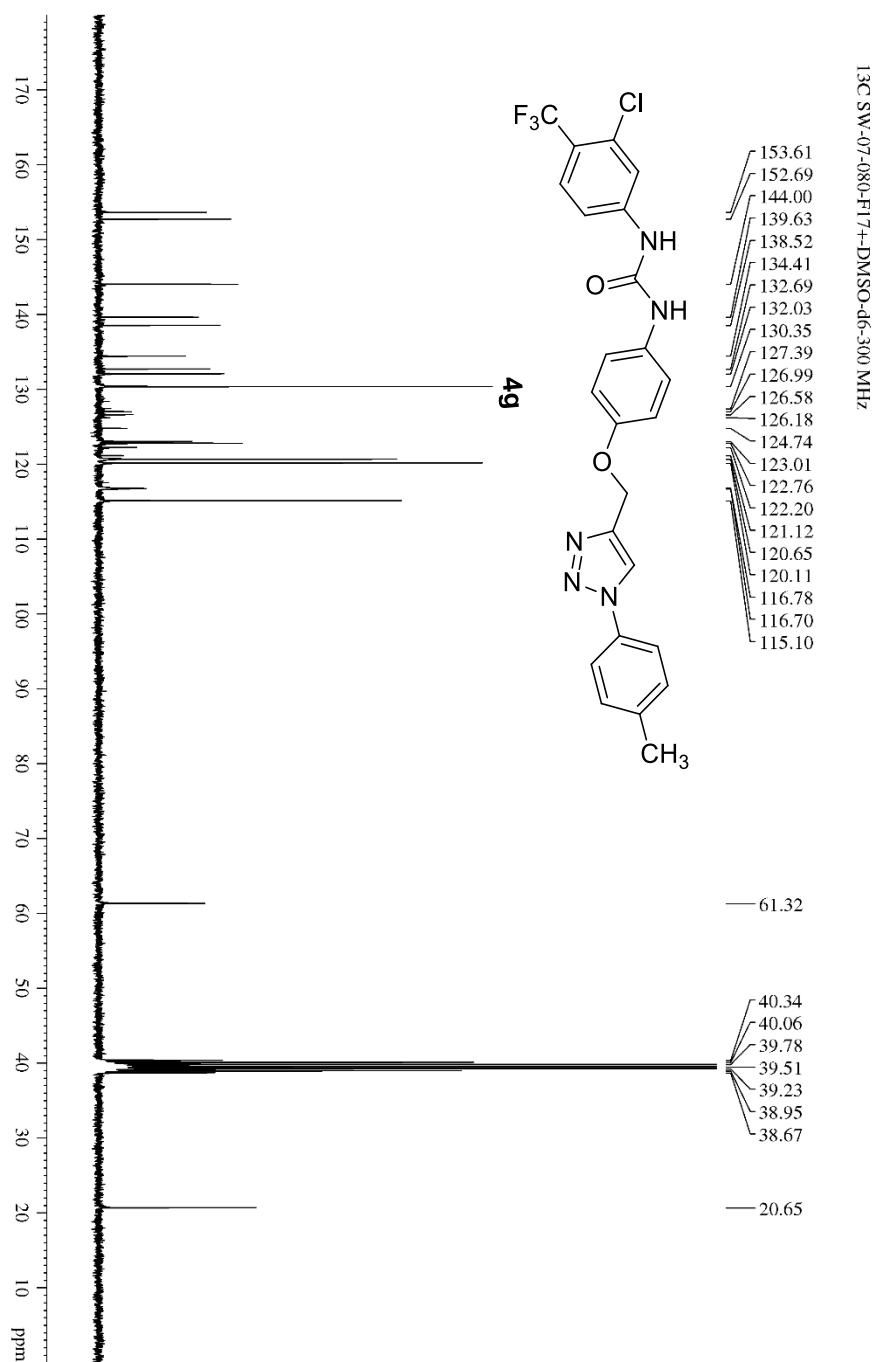
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



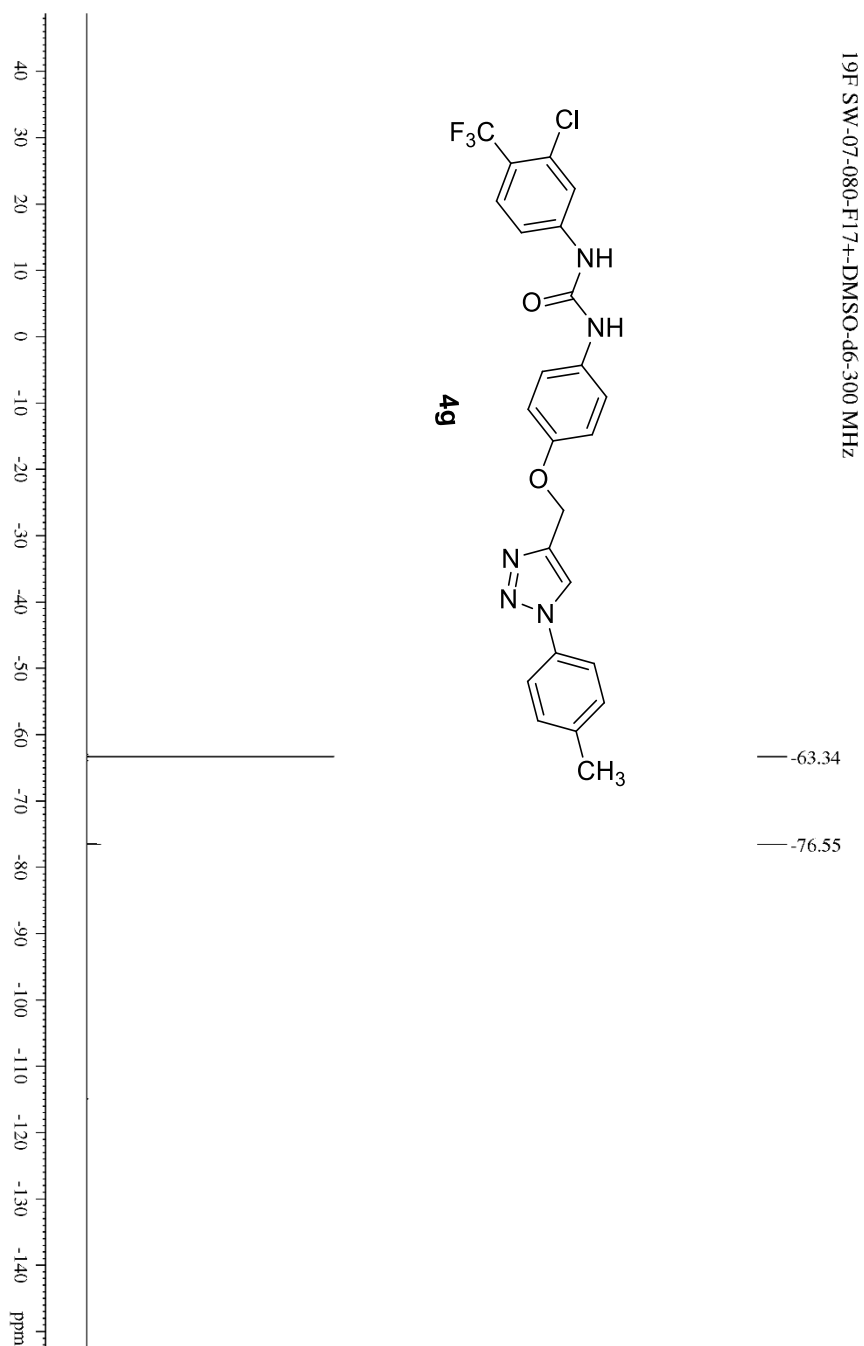
รูปภาพที่ 104 MS สเปกตรัมของ 4f

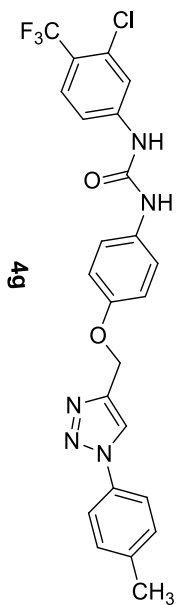


รูปภาพที่ 105 ^1H NMR สเปกตรัมของ **4g**



รูปภาพที่ 106 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4g

รูปภาพที่ 107 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4g



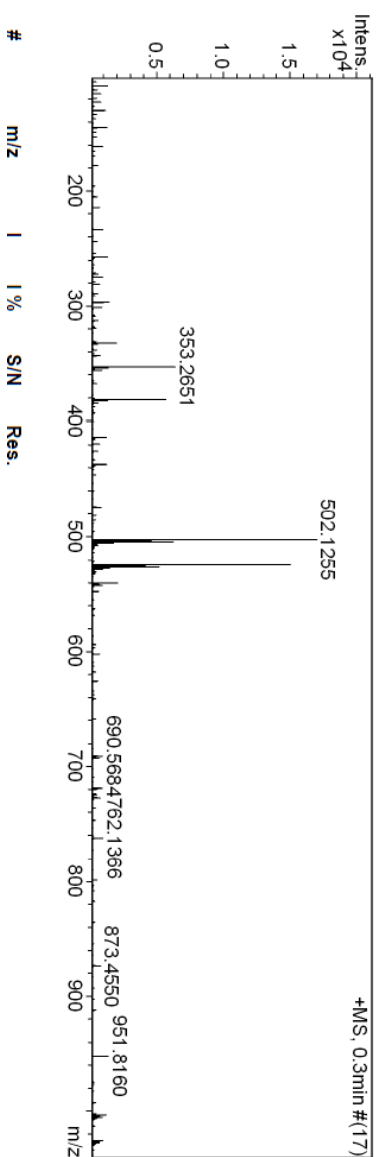
Mass Spectrum List Report

Analysis Info

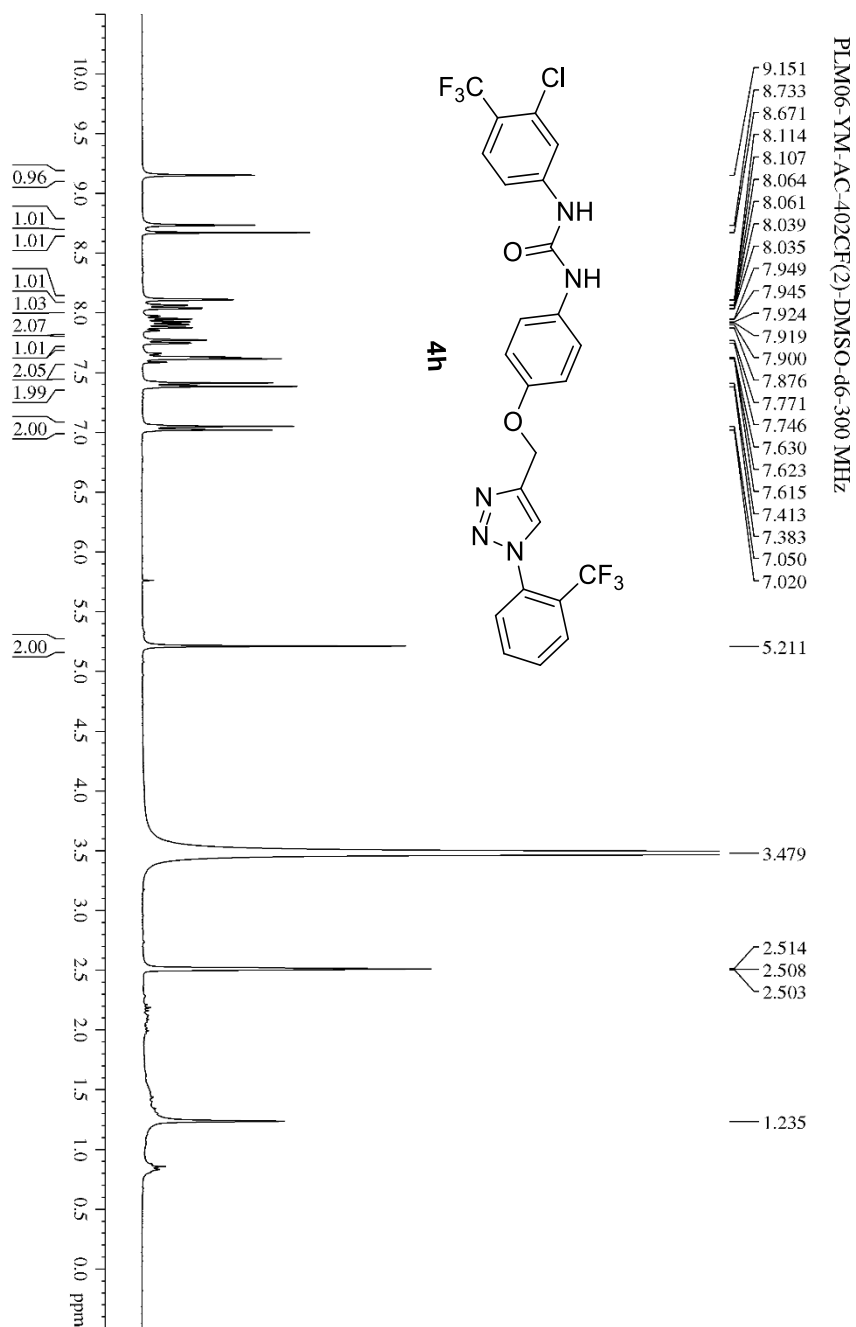
Analysis Name OSSSU05032019002.d Acquisition Date 3/5/2019 2:21:20 PM
 Method Tune_low_POS_2019.m Operator Administrator
 Sample Name 15 Instrument microTOF 72
 05022019

Acquisition Parameter

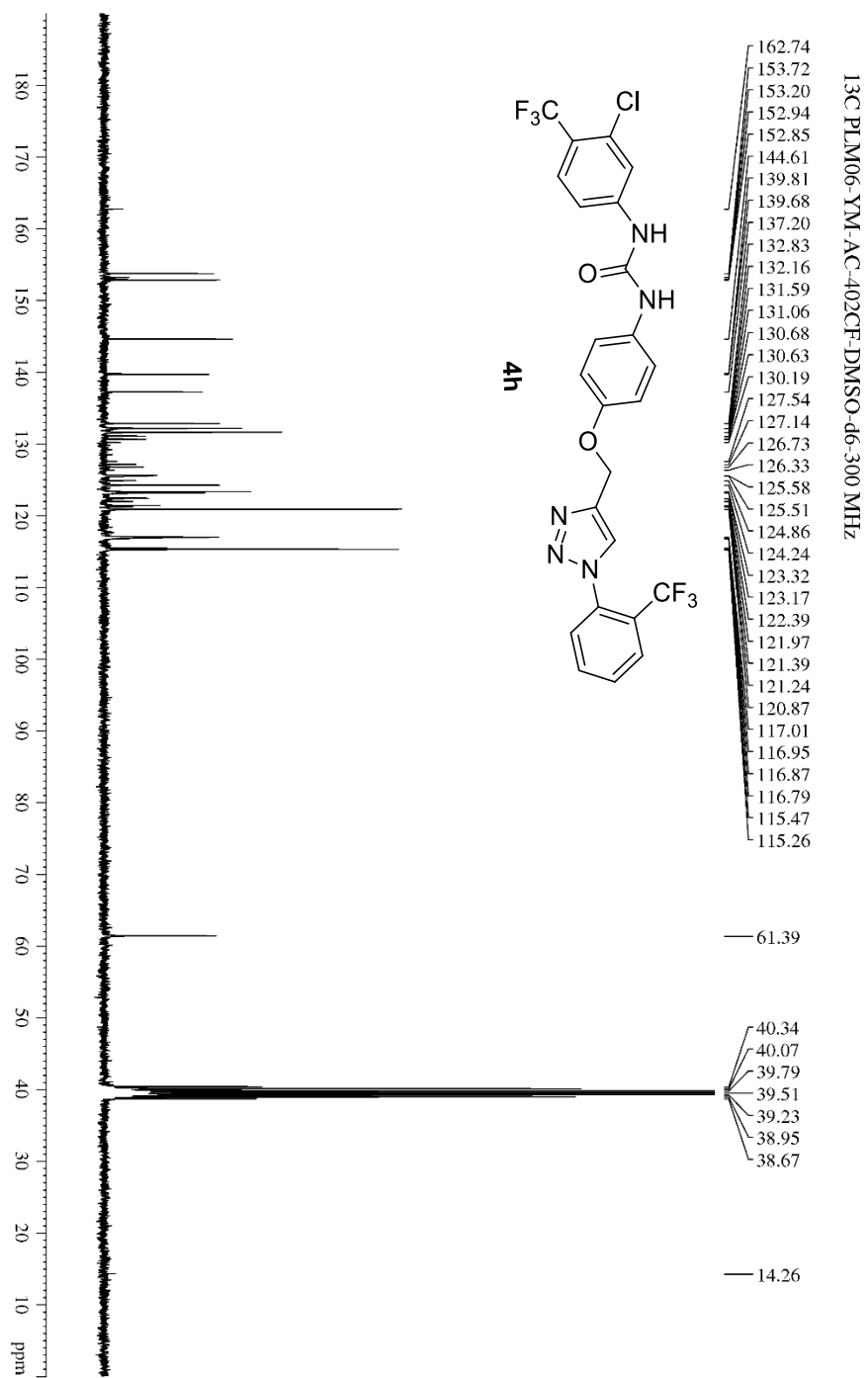
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Scan Range	n/a	Capillary Exit	150.0 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	150.0 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.0 V
		Hexapole 1	24.3 V
		Set Corrector Fill	50 V
		Set Pulsar Pull	337 V
		Set Pulsar Push	337 V
		Set Reflector	1300 V
		Set Flight Tube	9000 V
		Set Detector TOF	2295 V



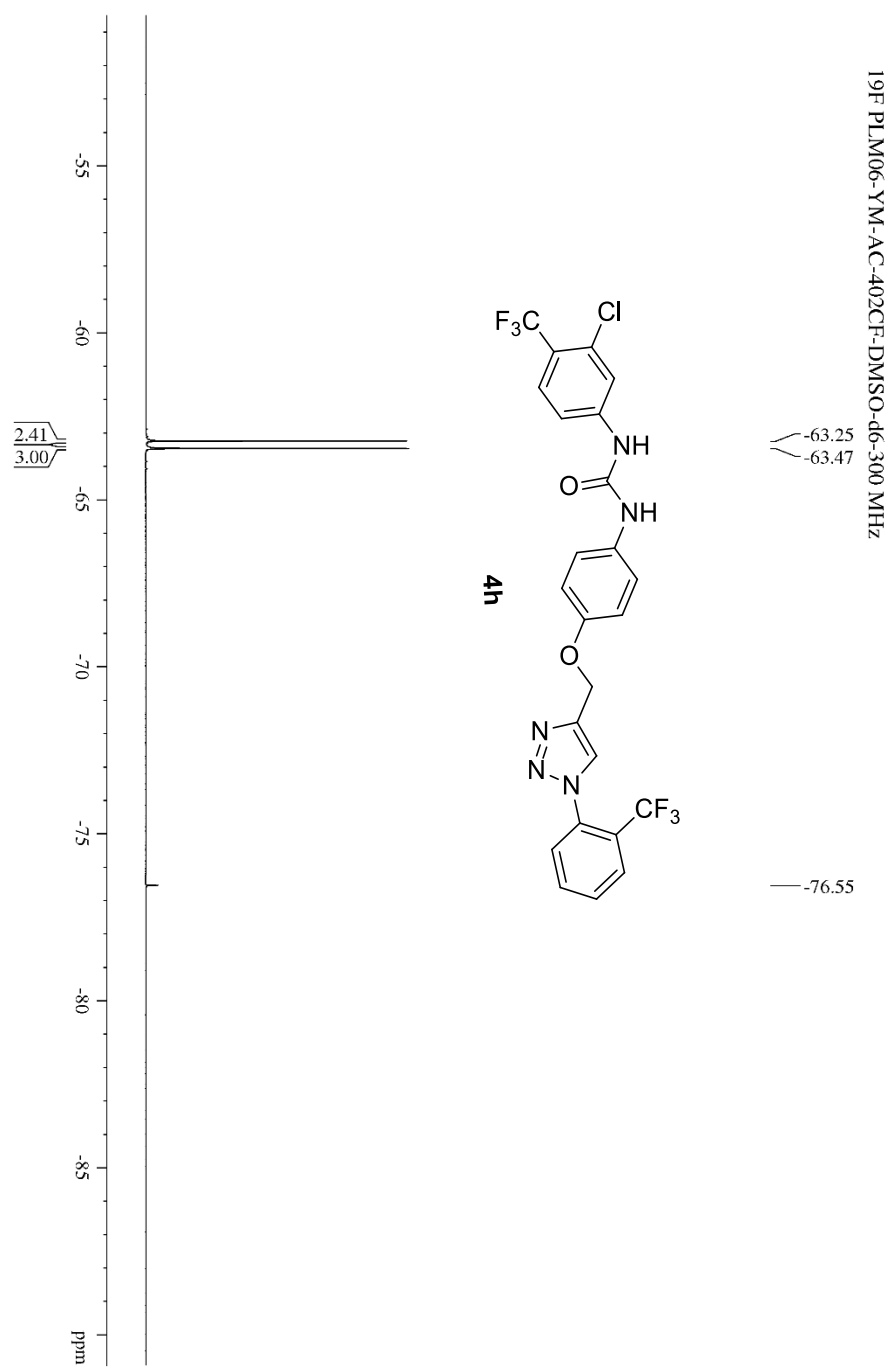
รูปภาพที่ 108 MS สเปกตรัมของ 4g

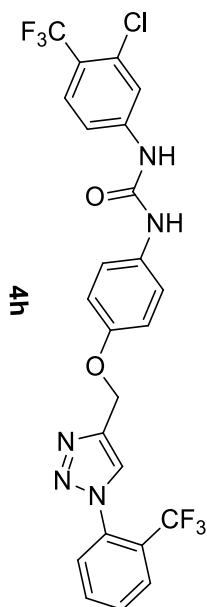


รูปภาพที่ 109 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4h



รูปภาพที่ 110 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 4h

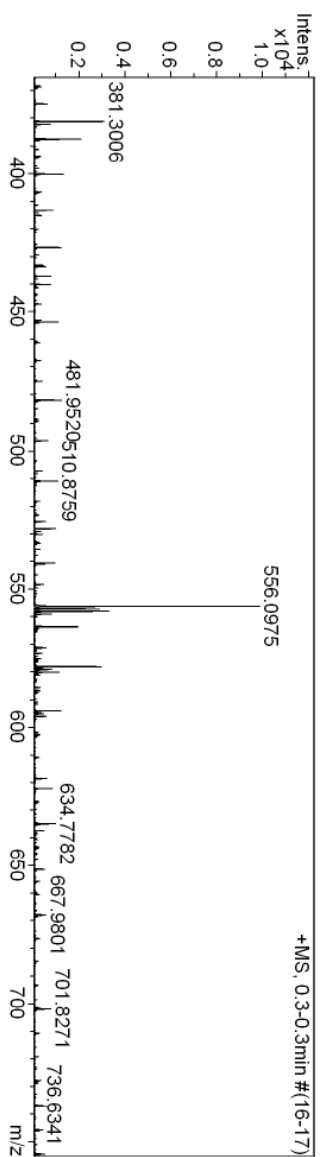
รูปภาพที่ 111 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4h



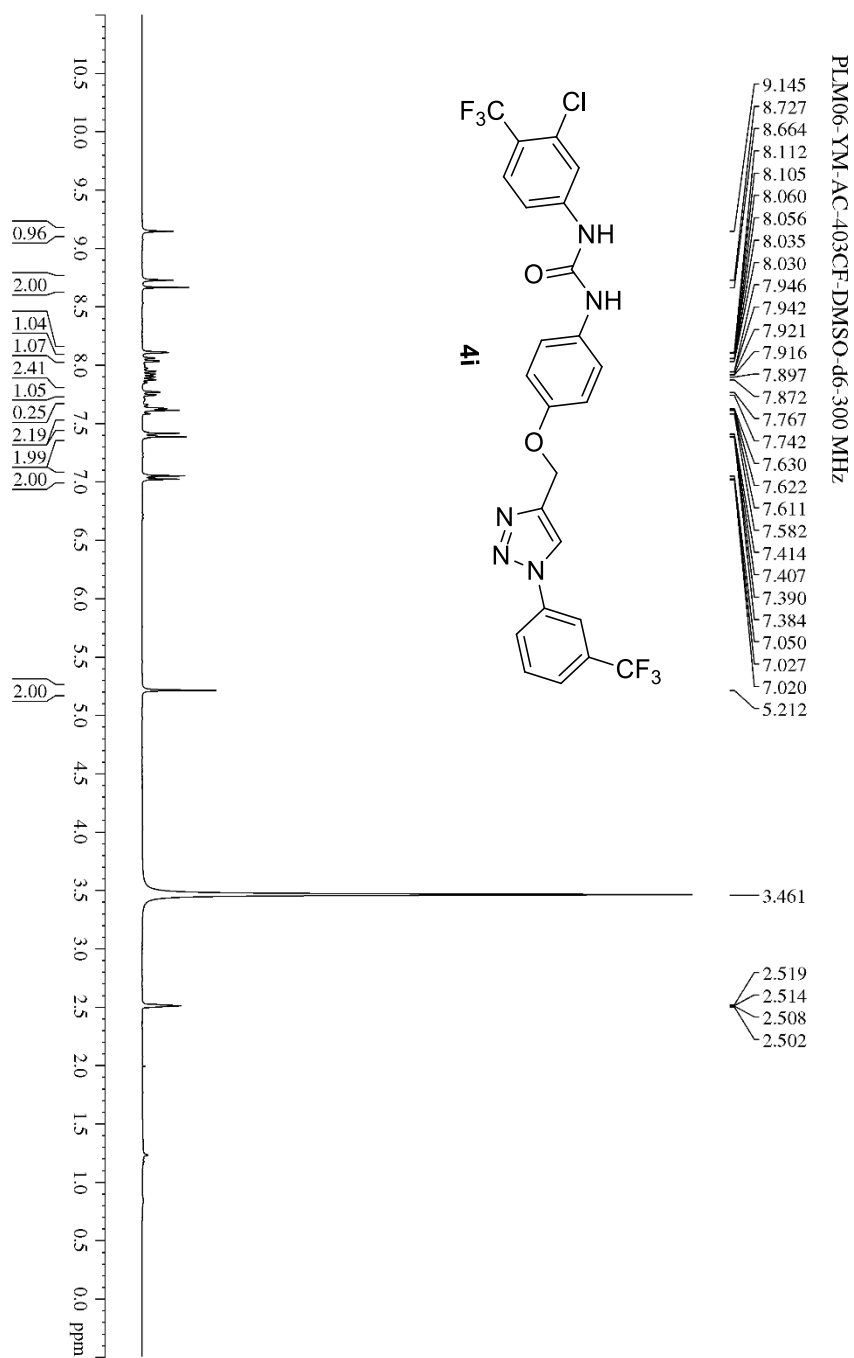
Mass Spectrum List Report

Analysis Info	Acquisition Date 3/5/2019 2:59:45 PM
Analysis Name OSSSU05032019005.d	Operator Administrator
Method Tune_low_POS_2019.m	Instrument microTOF
Sample Name 26	72
05032019	

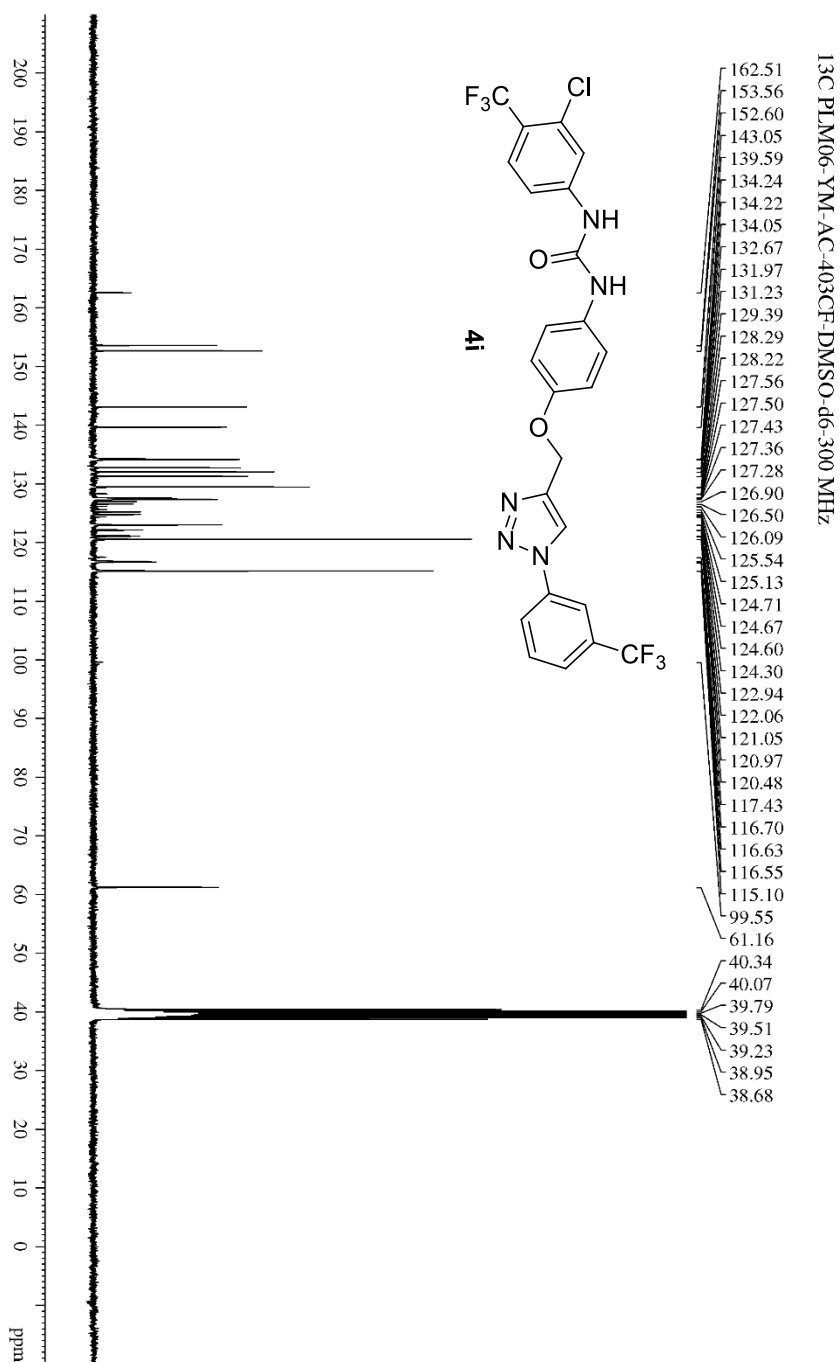
Acquisition Parameter	
Source Type ESI	Ion Polarity Positive
Scan Range n/a	Capillary Exit 160.0 V
Scan Begin 50 m/z	Hexapole RF 150.0 V
Scan End 3000 m/z	Skimmer 1 45.0 V
	Hexapole 1 24.3 V
	Set Corrector Fill 50 V
	Set Pulsar Pull 337 V
	Set Pulsar Push 337 V
	Set Reflector 1300 V
	Set Flight Tube 9000 V
	Set Detector TOF 2295 V



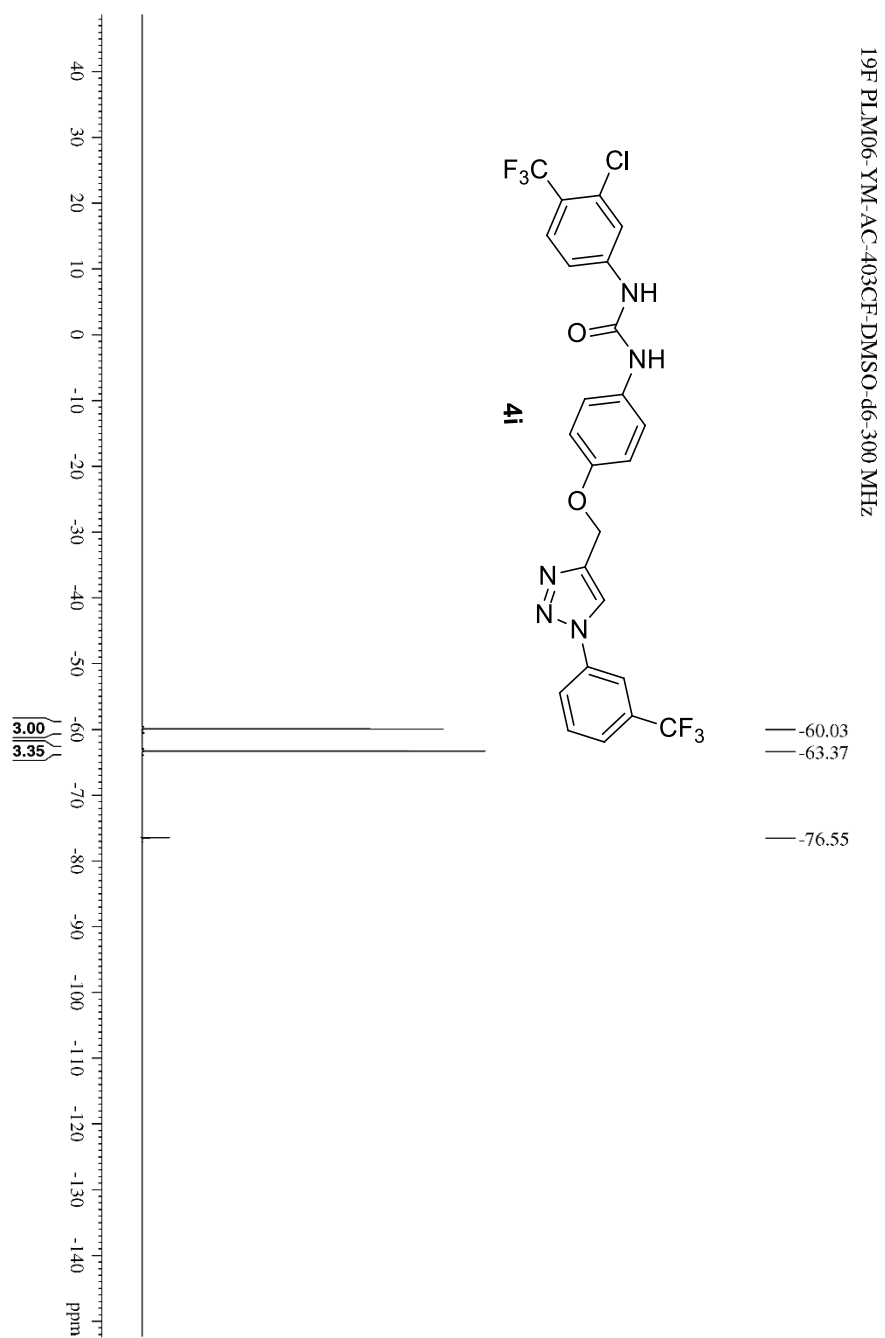
รูปภาพที่ 112 MS สเปกตรัมของ 4h

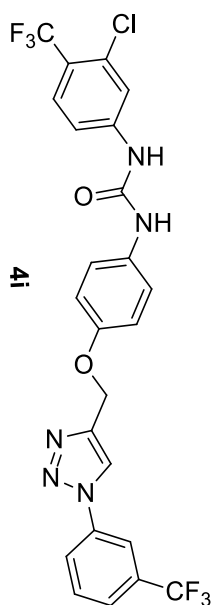


รูปภาพที่ 113 ¹H NMR สเปกตรัมของ **4i**



รูปภาพที่ 114 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4i

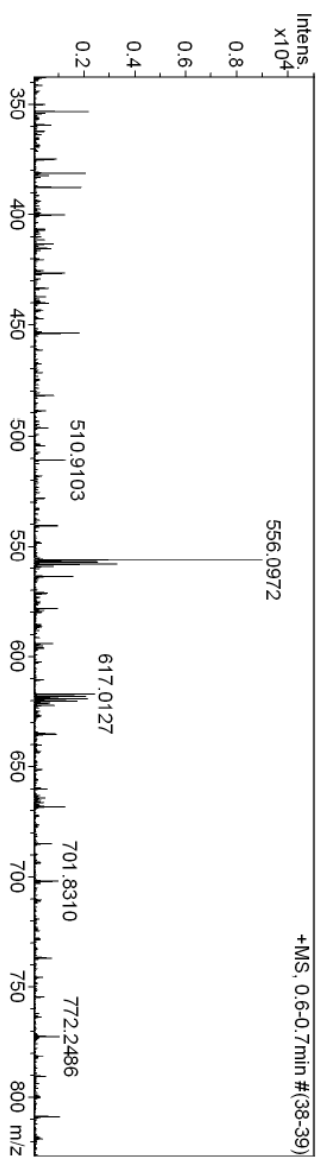
รูปภาพที่ 115 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4i



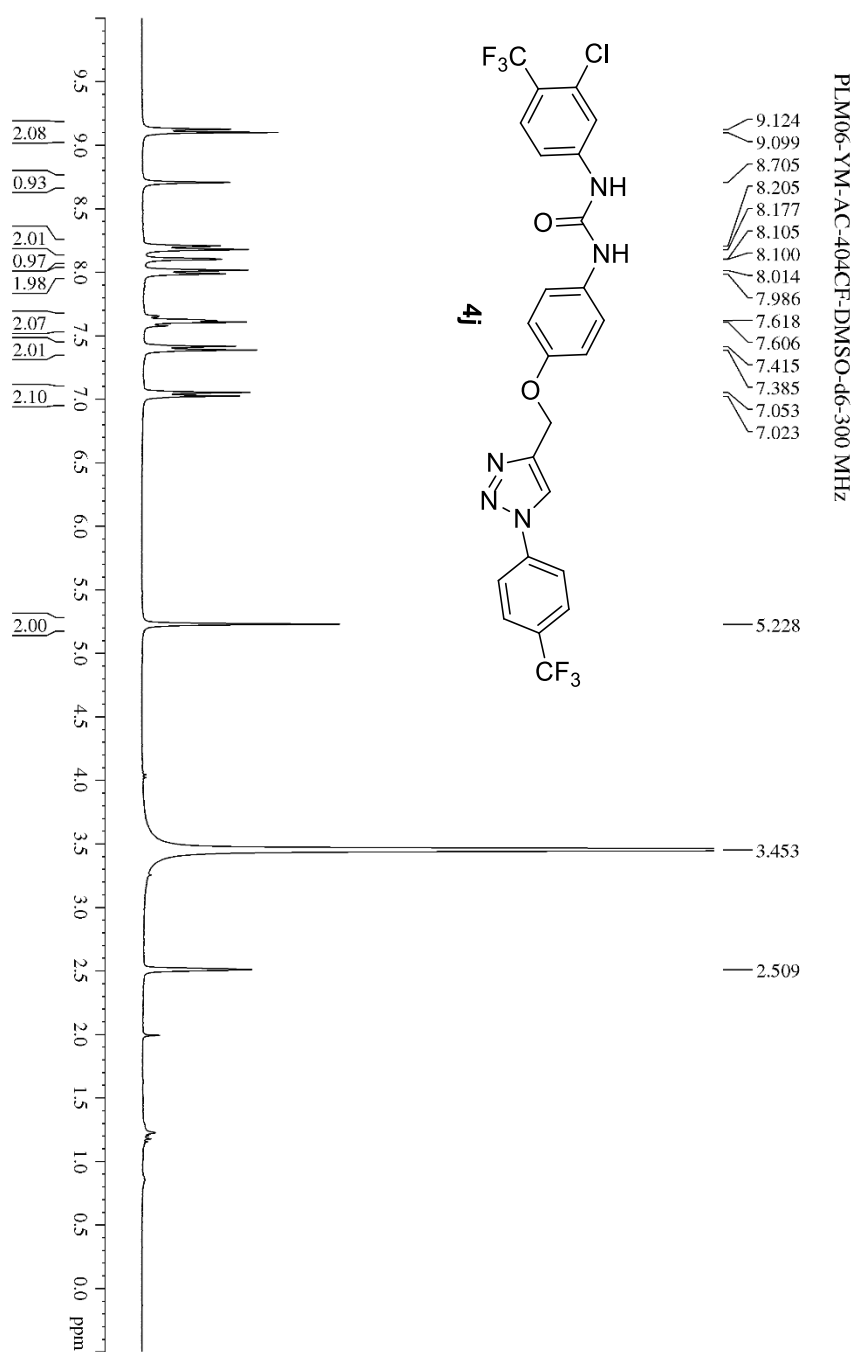
Mass Spectrum List Report

Analysis Info	Acquisition Date 3/5/2019 3:02:49 PM
Analysis Name OSSSU05032019006.d	Operator Administrator
Method Tune_Low_POS_2019.m	Instrument micrOTOF
Sample Name 27	72
05032019	

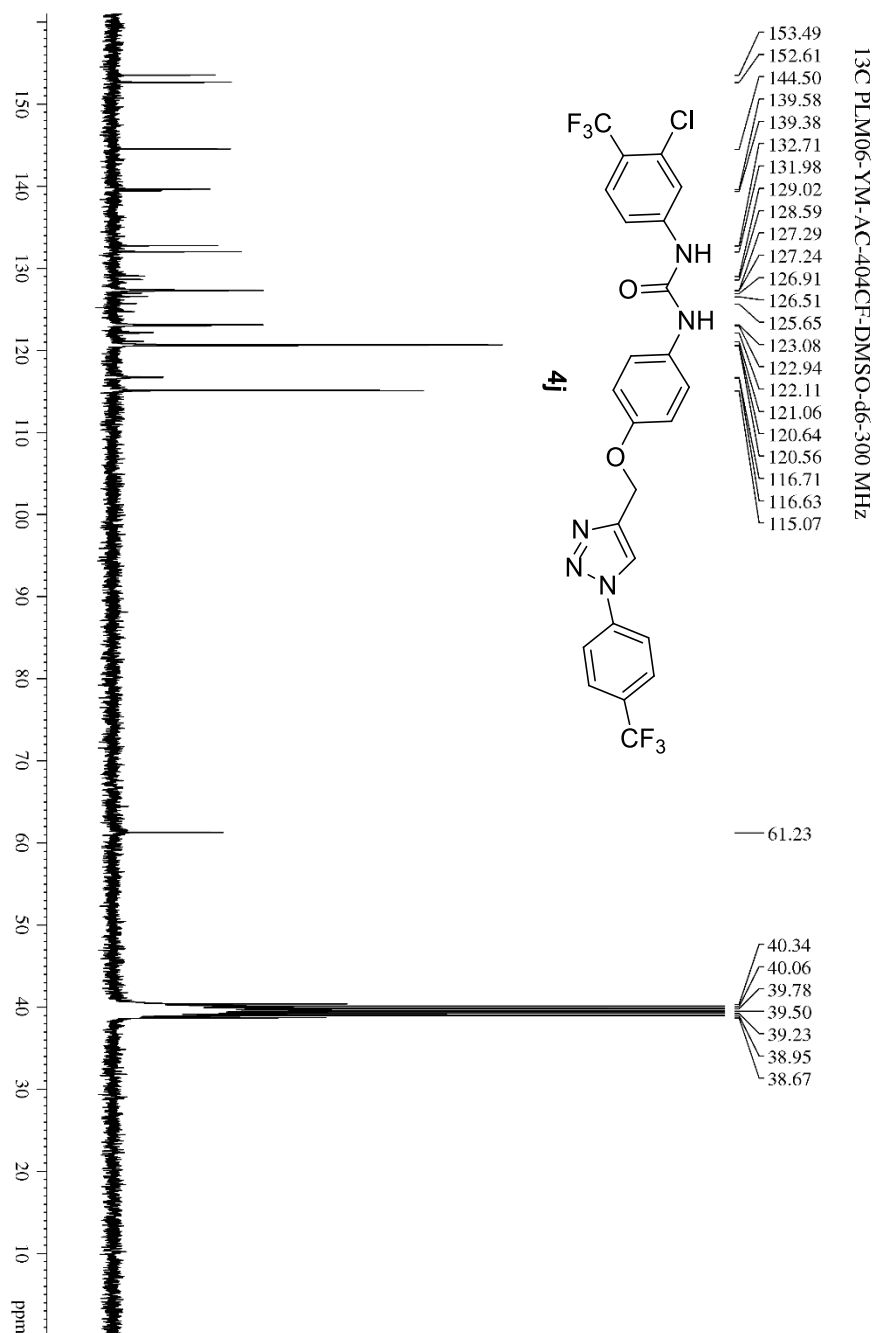
Acquisition Parameter			
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Scan Range	n/a	Capillary Exit	140.0 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	150.0 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.0 V
		Hexapole 1	24.3 V
		Set Corrector Fill	50 V
		Set Pulsar Pull	337 V
		Set Pulsar Push	337 V
		Set Reflector	1300 V
		Set Flight Tube	9000 V
		Set Detector TOF	2295 V



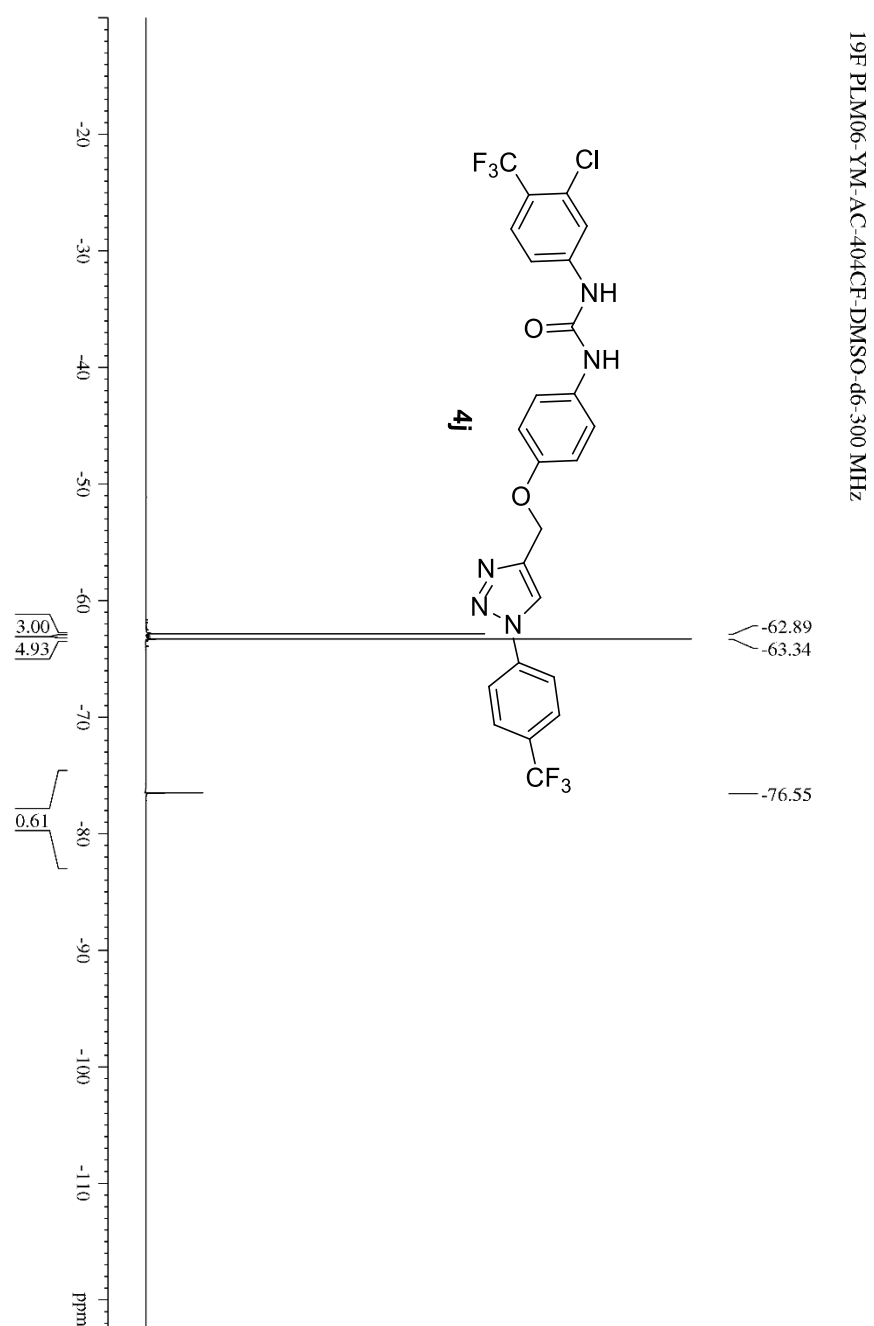
รูปภาพที่ 116 MS สเปกตรัมของ 4i

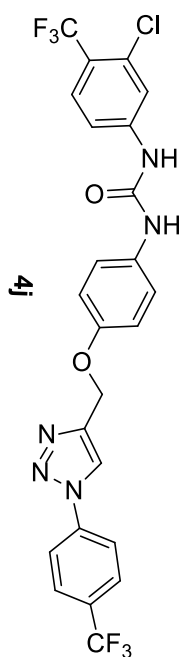


รูปภาพที่ 117 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4j



รูปภาพที่ 118 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4j

รูปภาพที่ 119 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4j

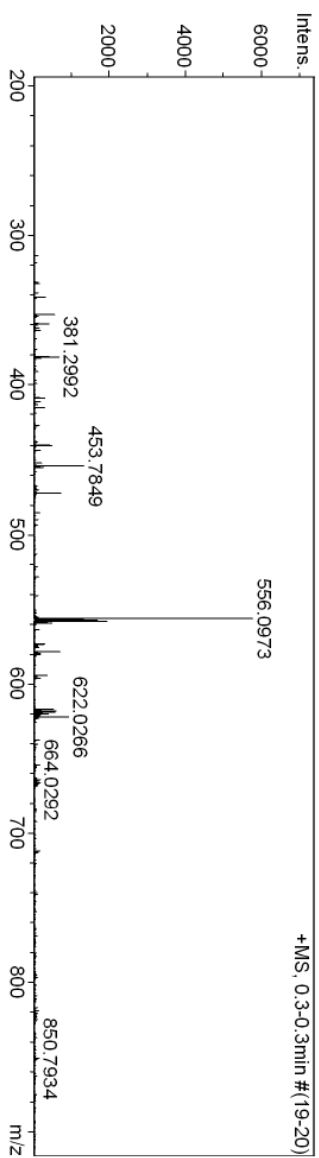


Mass Spectrum List Report

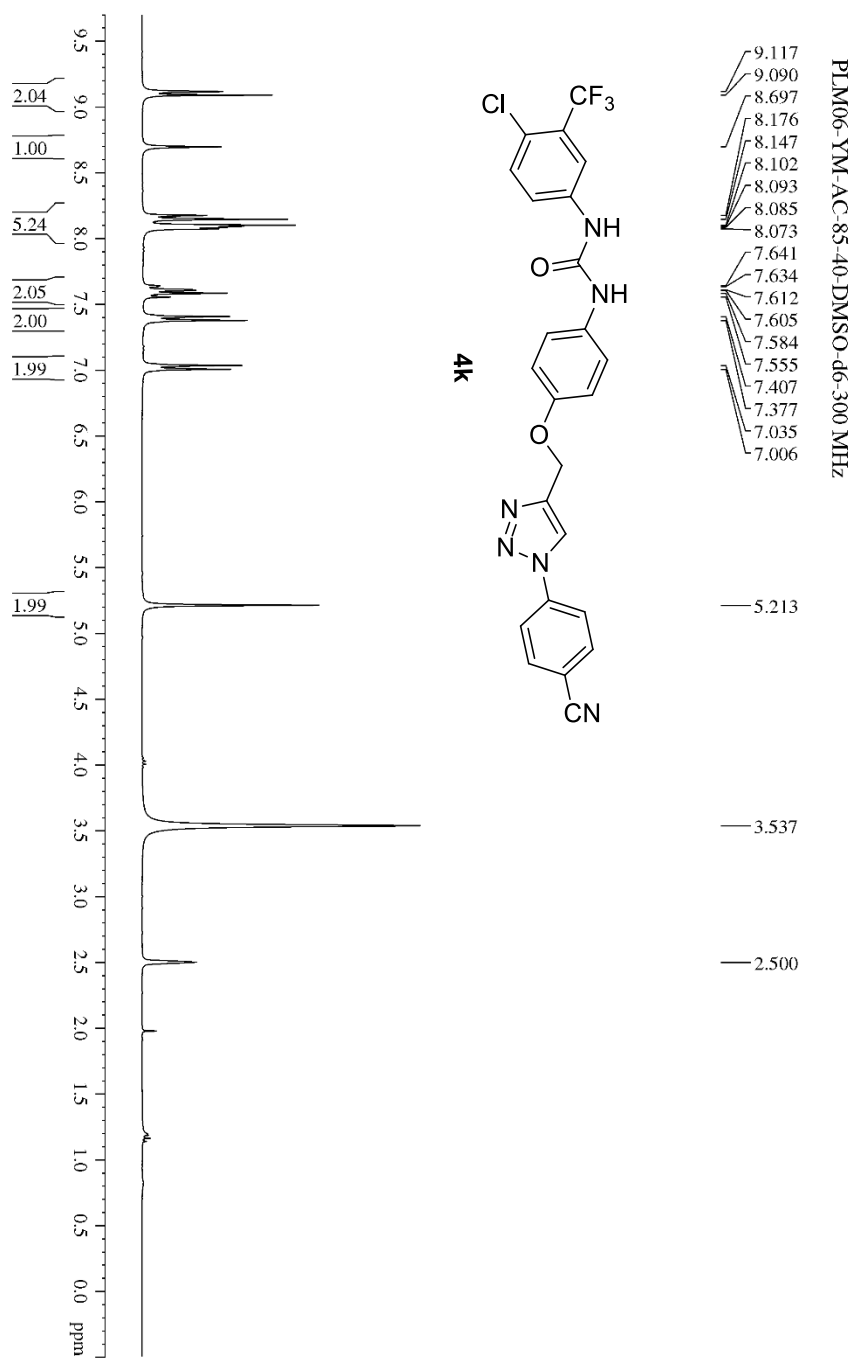
Analysis Info
 Analysis Name OSSFU05032019007_2.d Acquisition Date 3/5/2019 3:44:54 PM
 Method Tune_low_80_POS_2019.m Operator Administrator
 Sample Name 28 Instrument micrOTOF 72

Acquisition Parameter

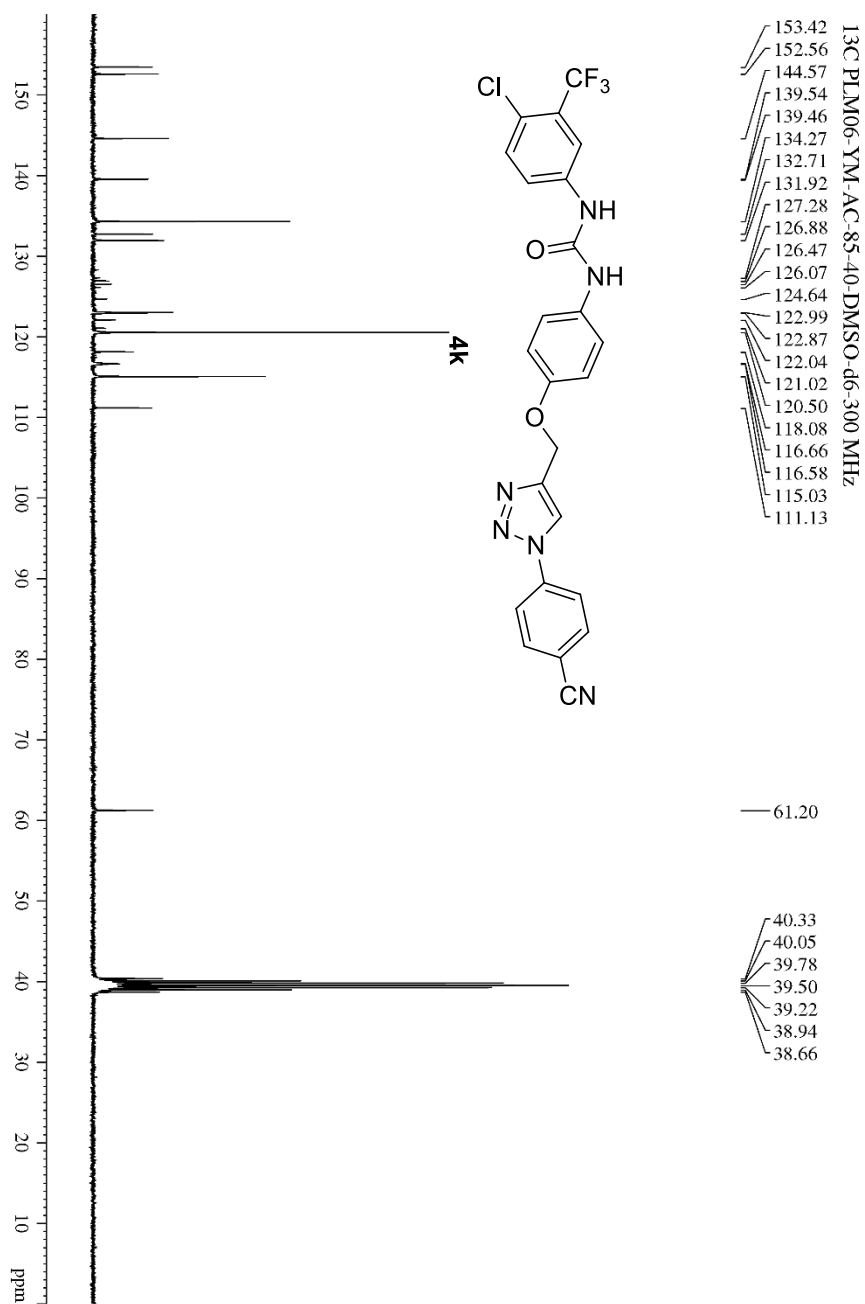
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Corrector Fill	50 V
Scan Range	n/a	Capillary Exit	130.0 V	Set Pulsar Pull	337 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	400.0 V	Set Pulsar Push	337 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.0 V	Set Reflector	1300 V
		Hexapole 1	24.3 V	Set Flight Tube	9000 V
				Set Detector TOF	2295 V



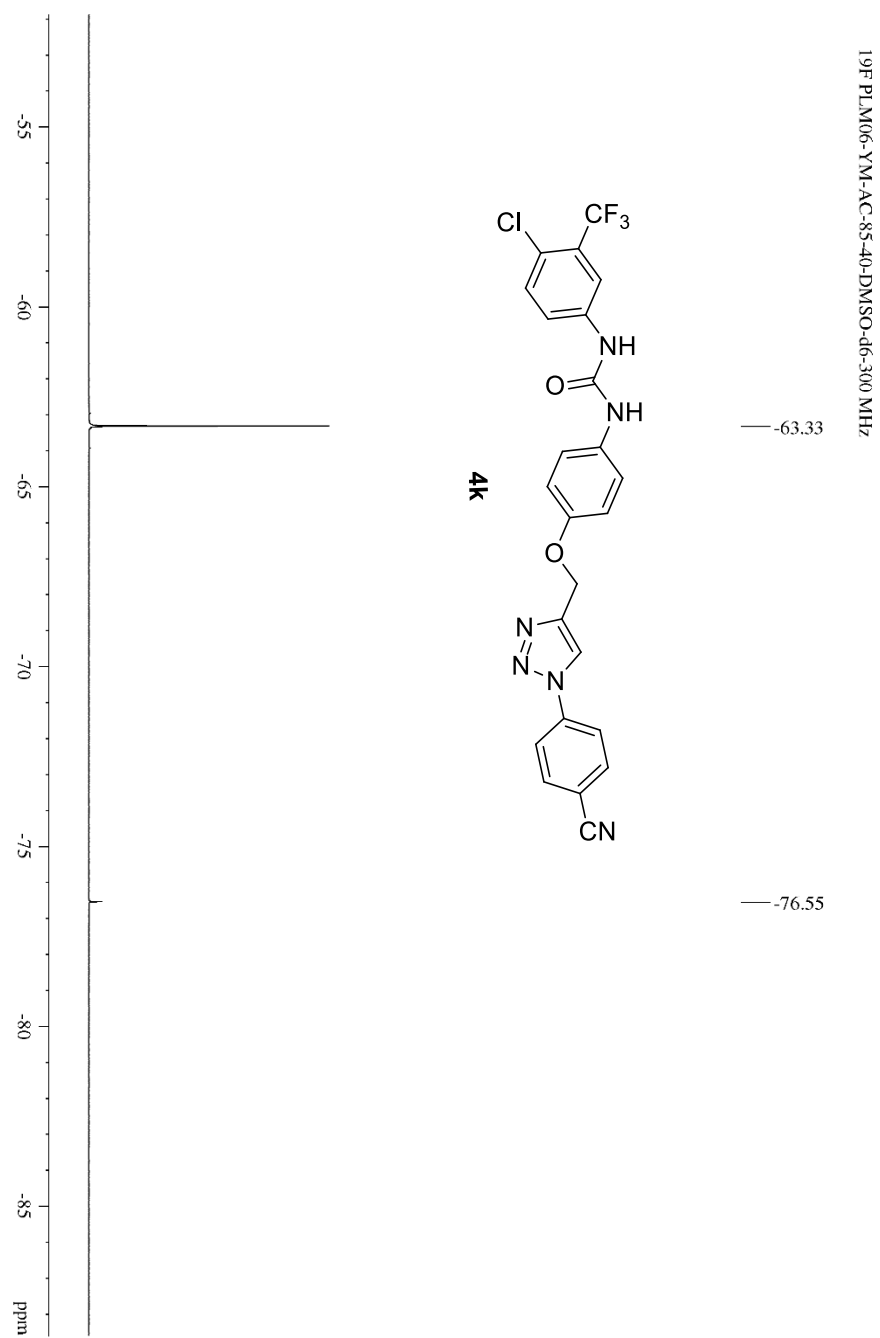
รูปภาพที่ 120 MS สเปกตรัมของ 4j



รูปภาพที่ 121 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4k



รูปภาพที่ 122 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4k

รูปภาพที่ 123 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4k

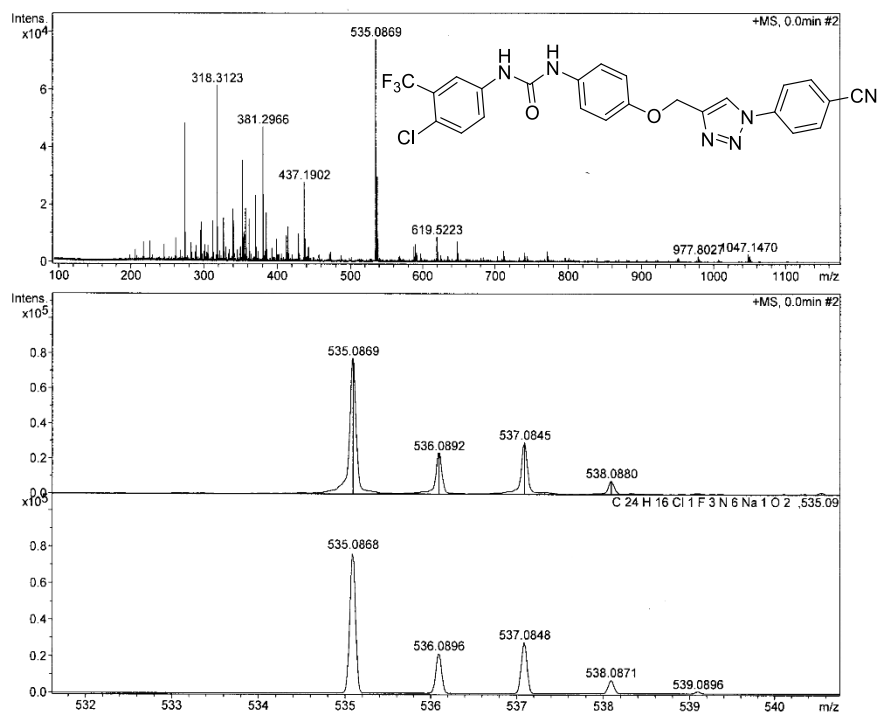
 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

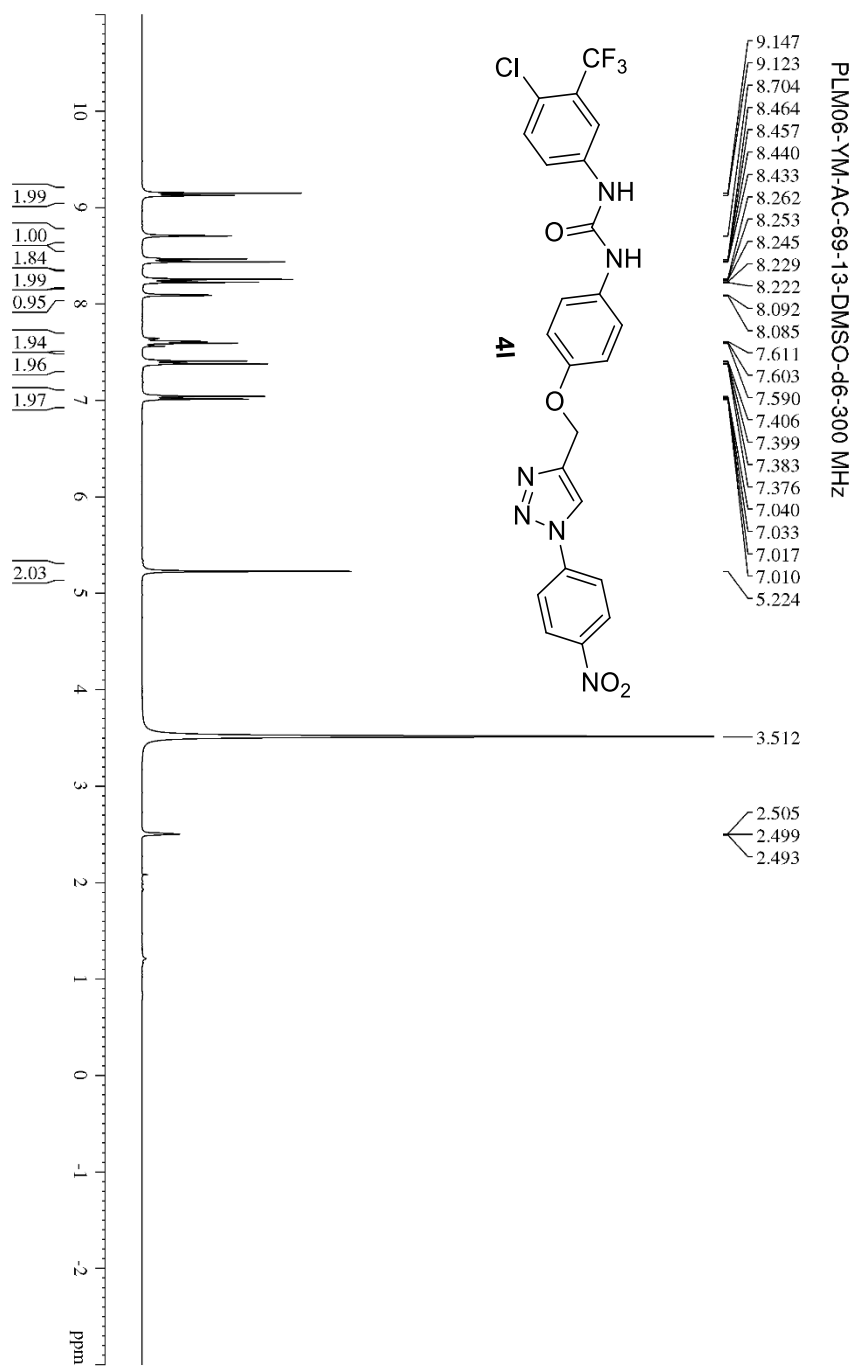
Analysis Name	C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\picus\IP 4CN.d	Acquisition Date	7/25/2017 12:38:42 PM	
Method	NaFormate_pos.m	Operator	Stuichai	Ext: 3560
Sample Name	P 4 CN	Instrument	micrOTOF	Bruker
		Calibrate by	Sodium Formate	

Acquisition Parameter

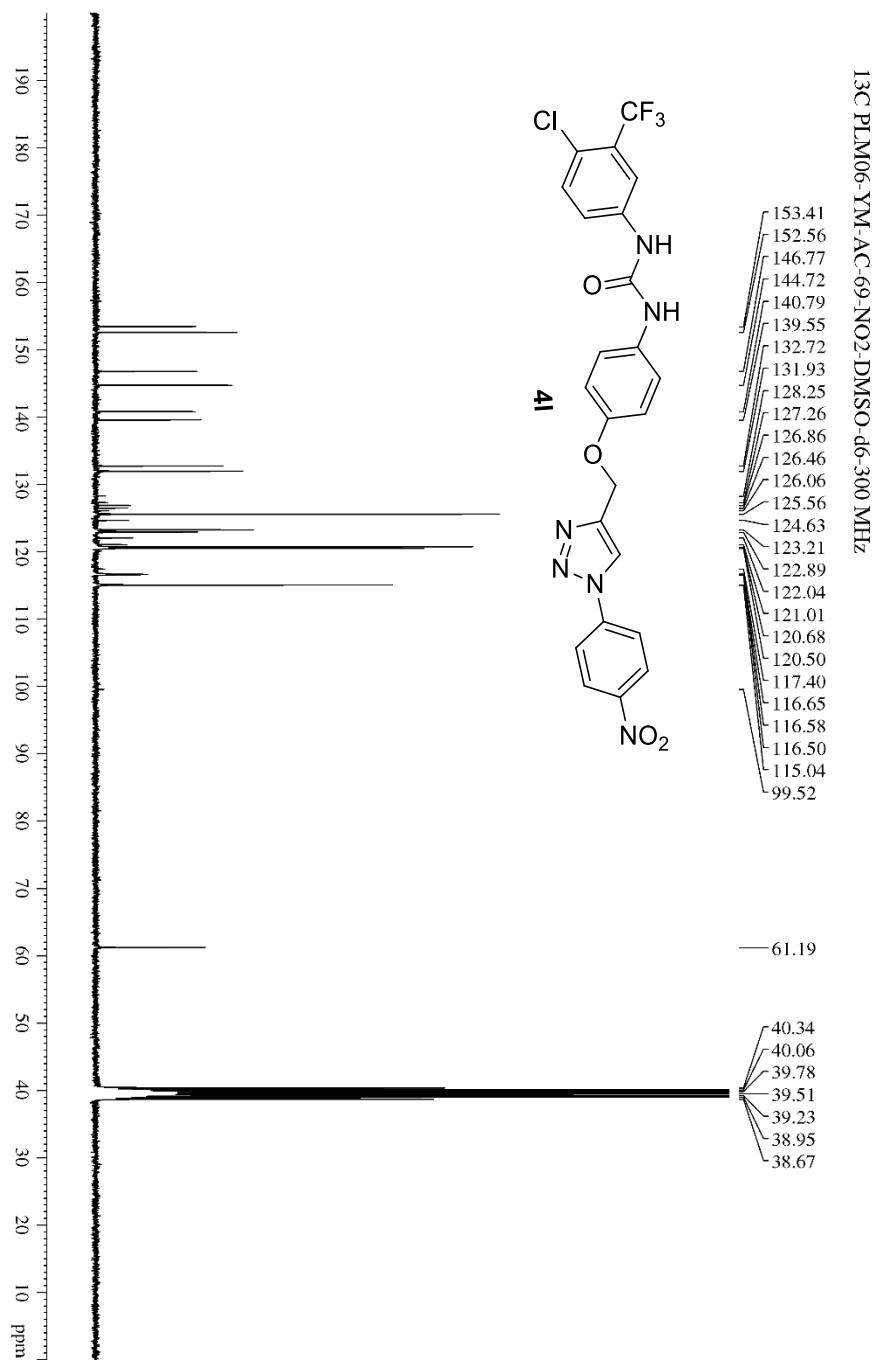
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



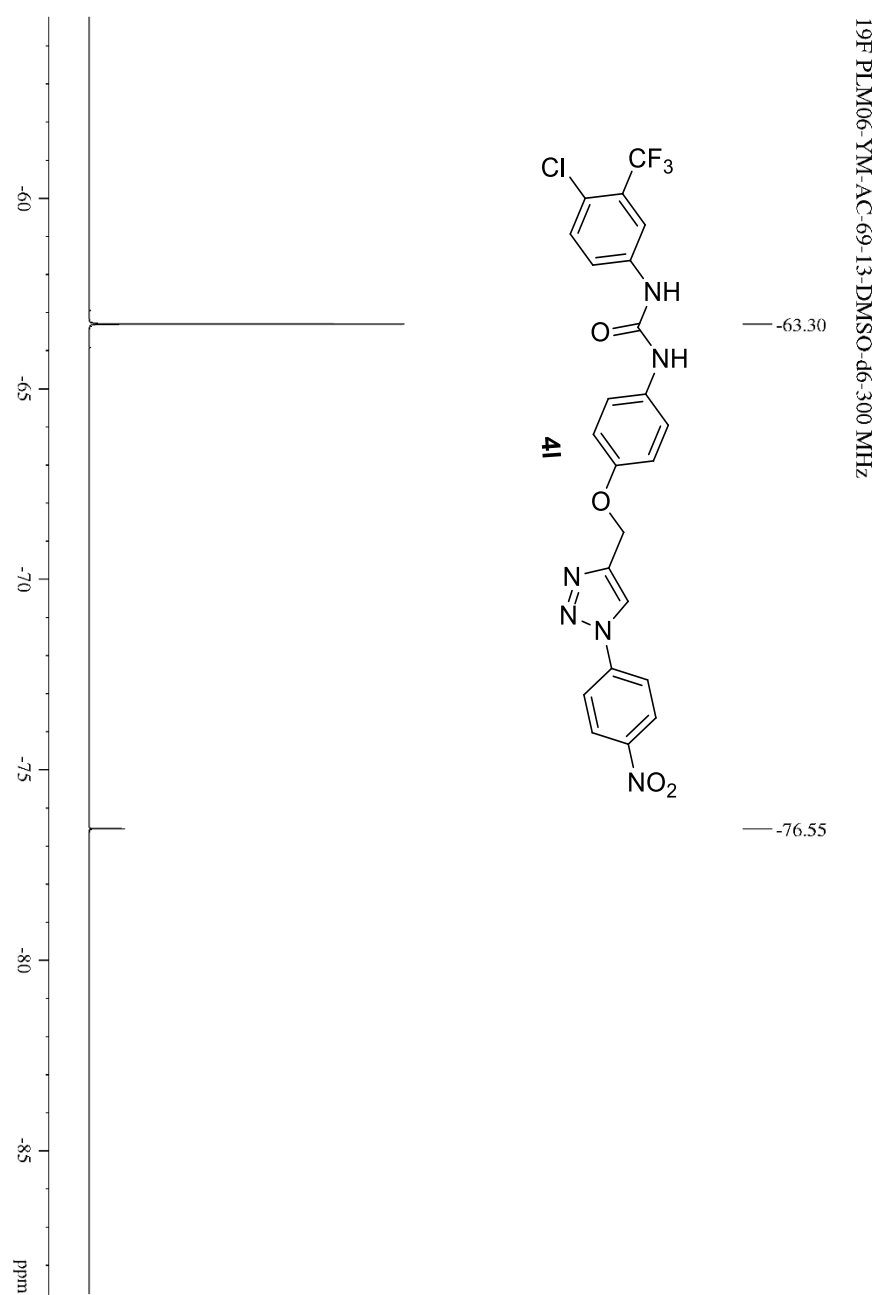
รูปภาพที่ 124 MS สเปกตรัมของ 4k



รูปภาพที่ 125 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4l



รูปภาพที่ 126 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4l



รูปภาพที่ 127 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4l

BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

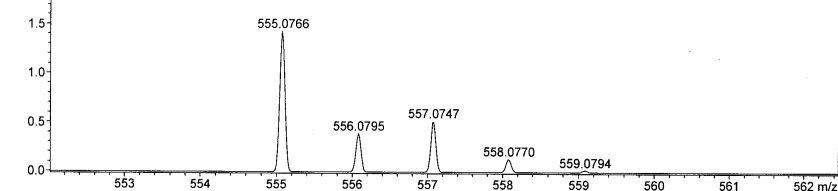
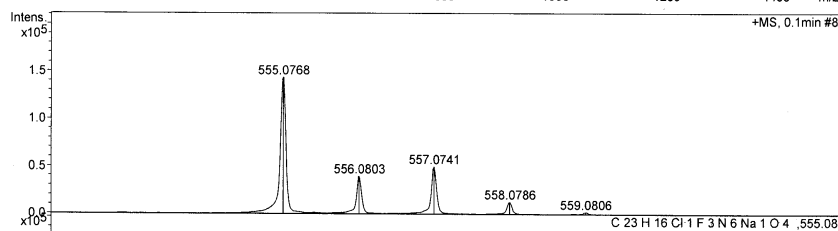
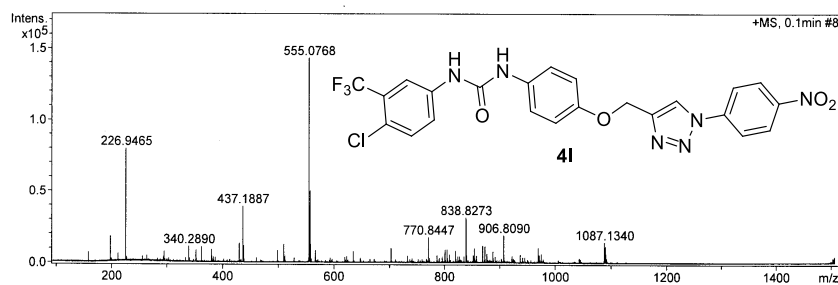
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\P 4NO2.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name P 4 NO2

Acquisition Date 7/25/2017 12:36:06 PM

Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

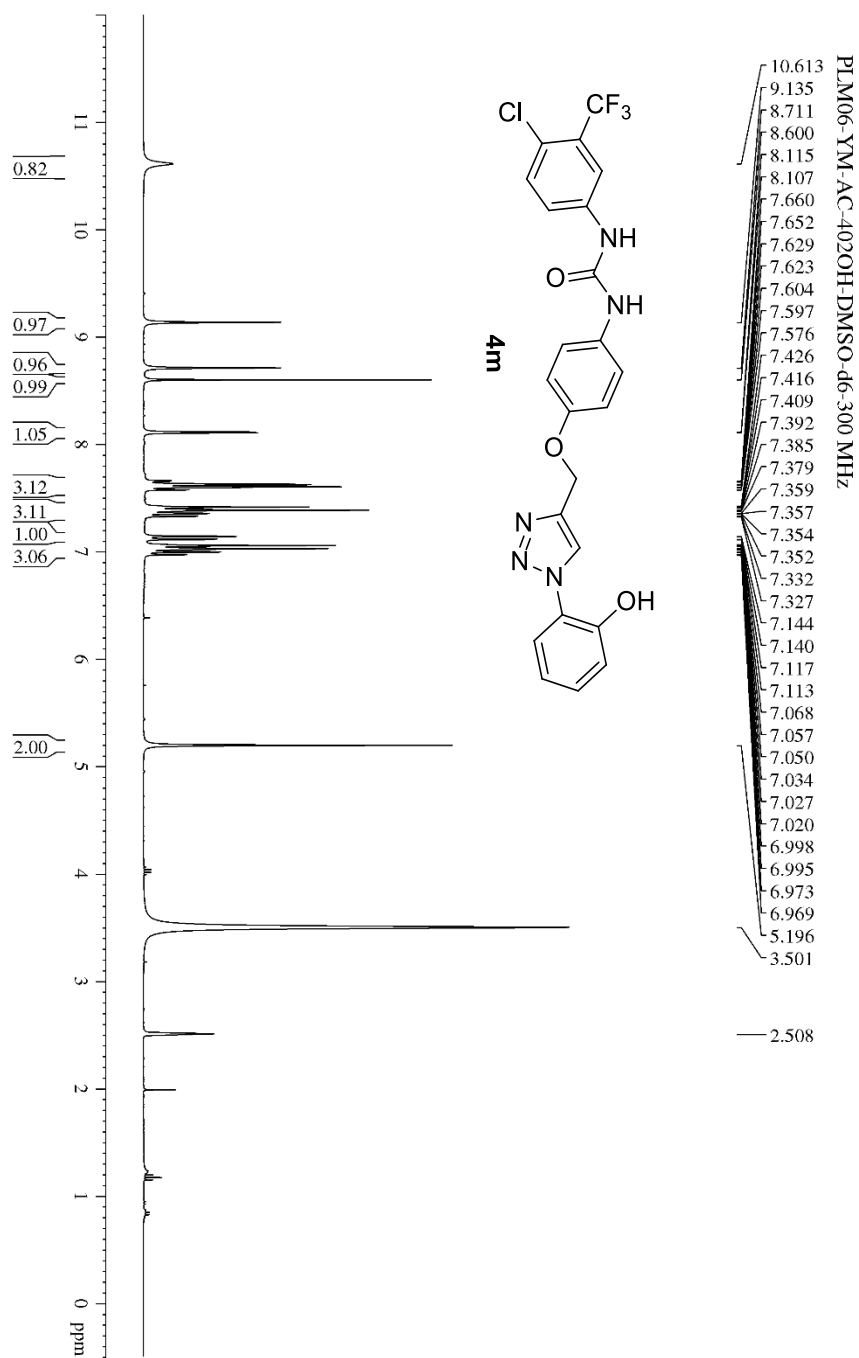


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

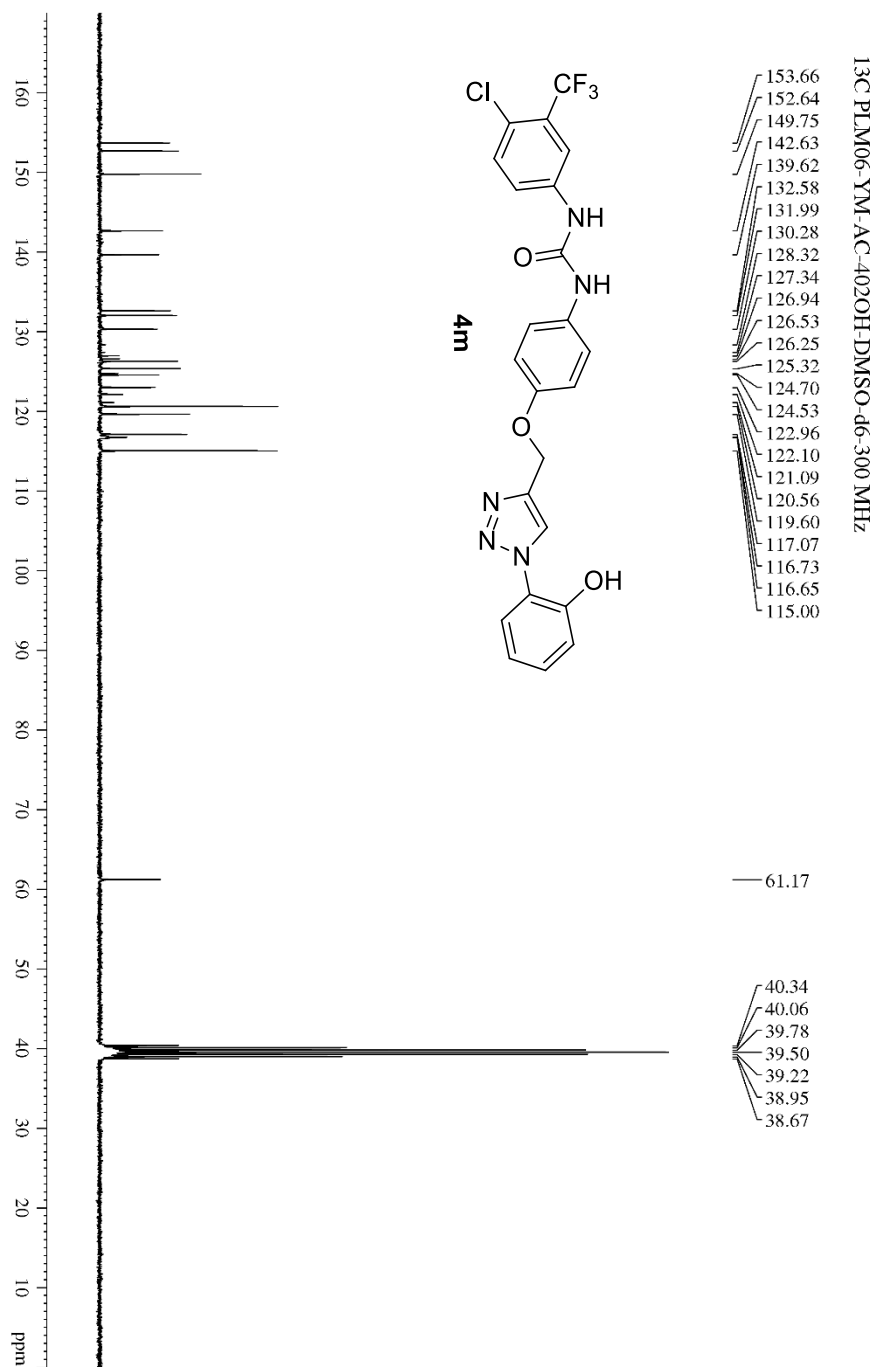
printed: 7/27/2017 9:20:26 AM

Page 1 of 1

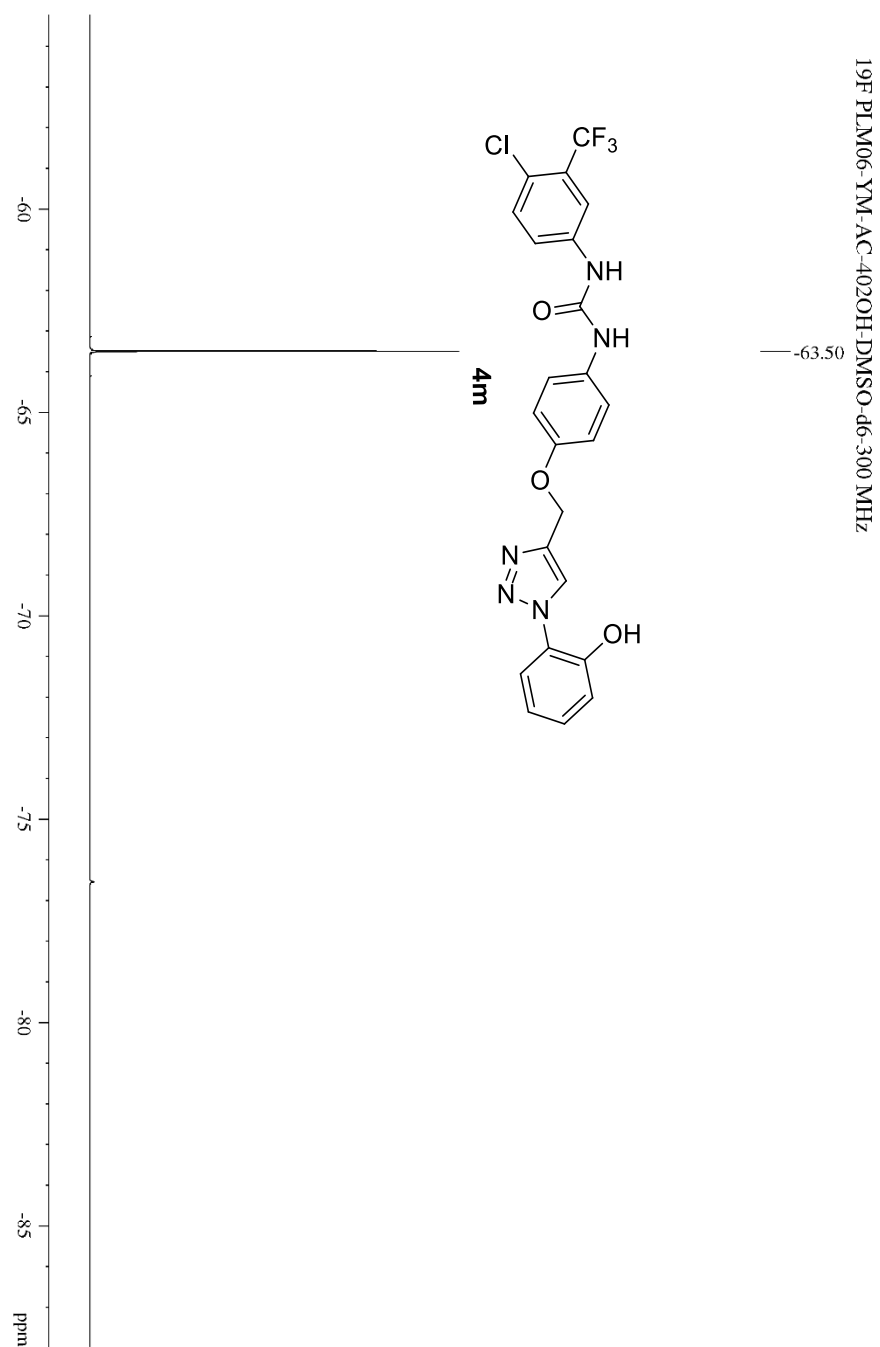
รูปภาพที่ 128 MS สเปกตรัมของ 4l



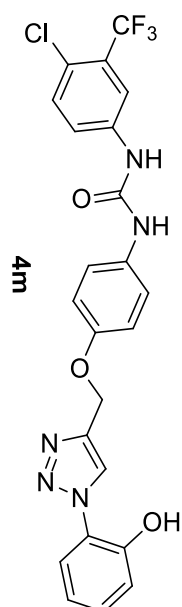
รูปภาพที่ 129 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4m



รูปภาพที่ 130 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 4m



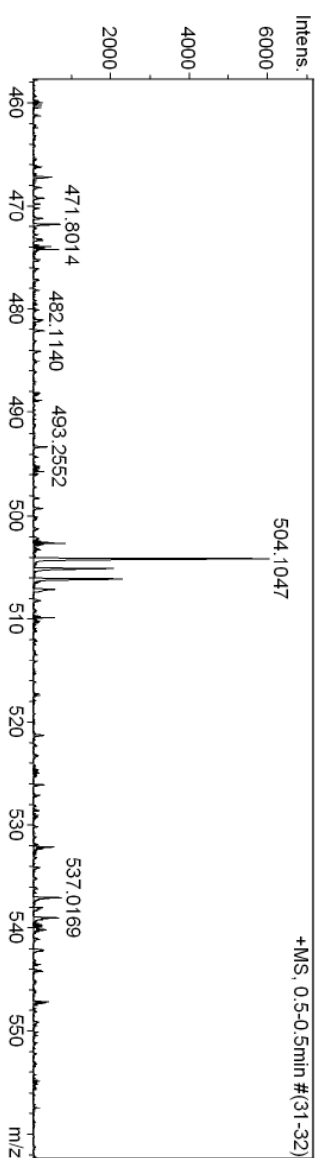
รูปภาพที่ 131 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4m



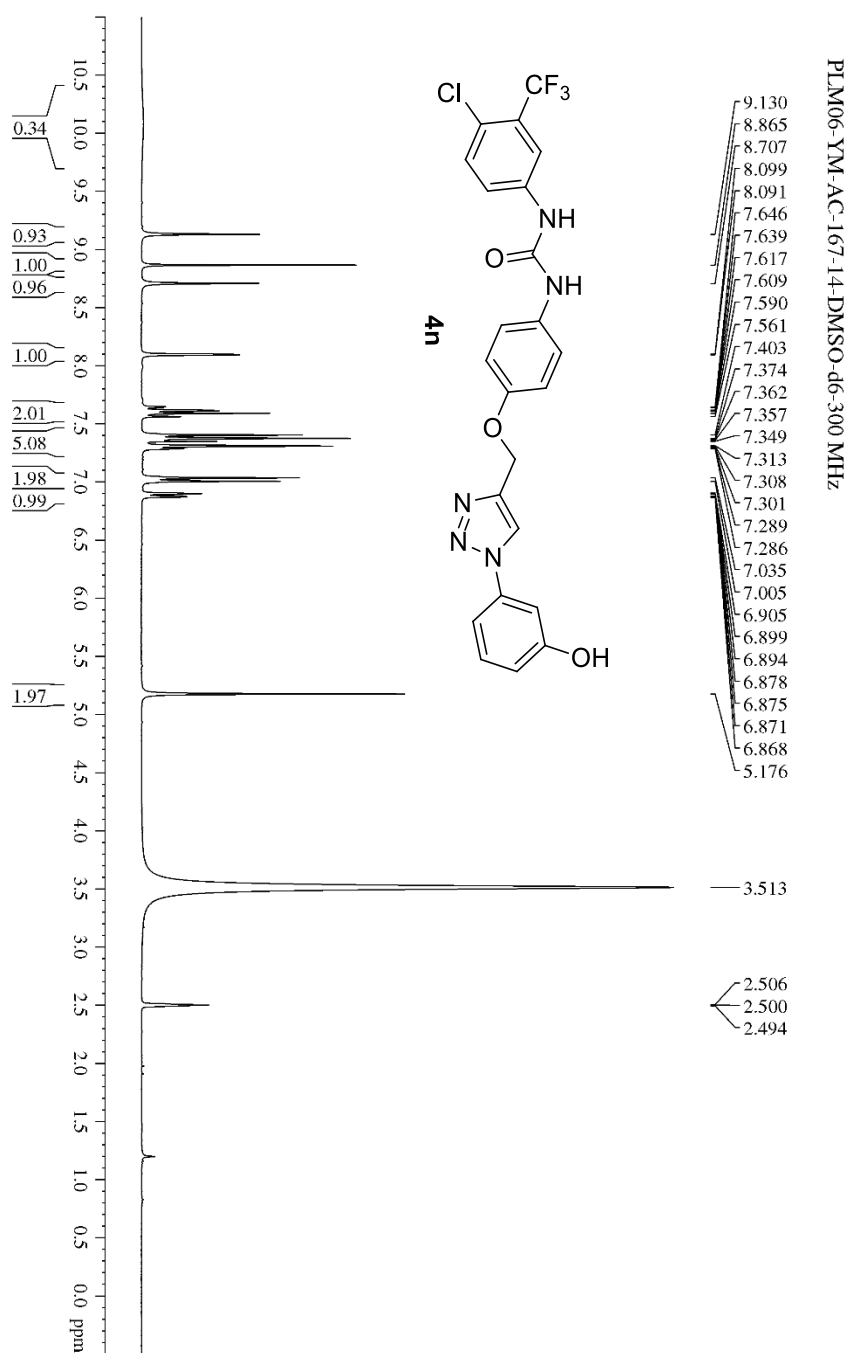
Mass Spectrum List Report

Analysis Info	Acquisition Date 3/5/2019 2:34:48 PM
Analysis Name OSSSU05032019004_2.d	Operator Administrator
Method Tune_low_POS_2019.m	Instrument micrOTOF
Sample Name 24	72
05022019	

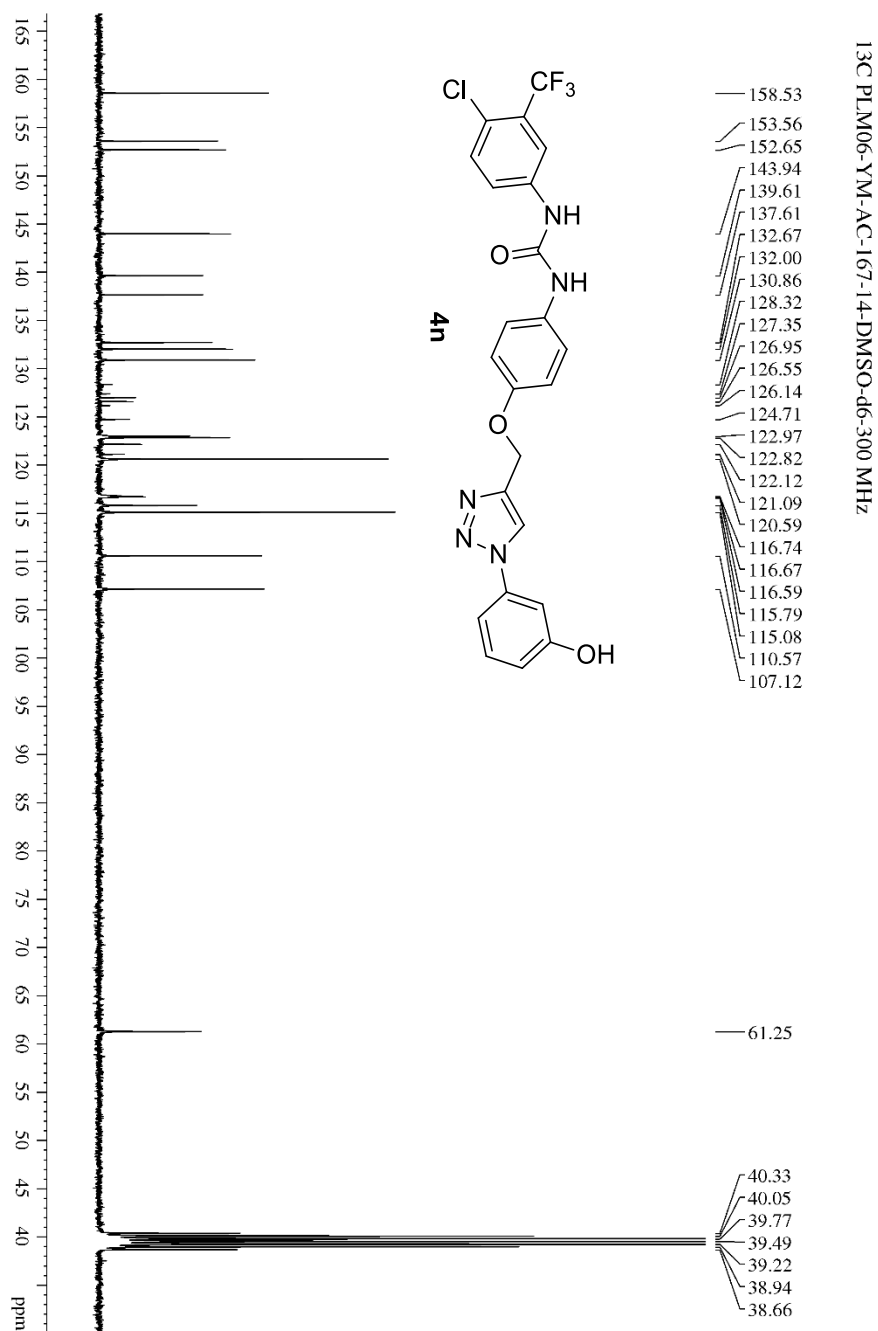
Acquisition Parameter			
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive
Scan Range	n/a	Capillary Exit	130.0 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	150.0 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.0 V
		Hexapole 1	24.3 V
		Set Corrector Fill	50 V
		Set Pulsar Pull	337 V
		Set Pulsar Push	337 V
		Set Reflector	1300 V
		Set Flight Tube	9000 V
		Set Detector TOF	2295 V



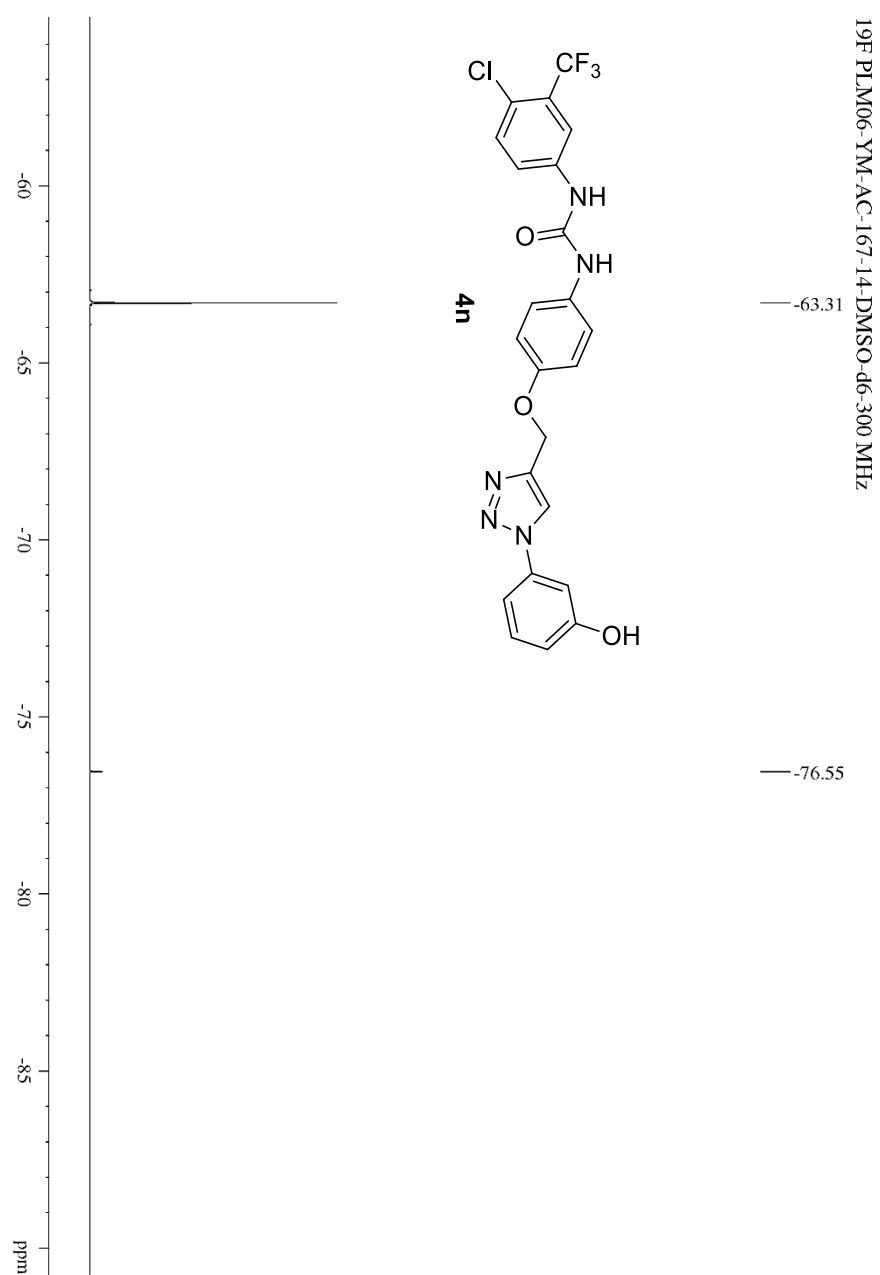
รูปภาพที่ 132 MS สเปกตรัมของ 4m



รูปภาพที่ 133 ^1H NMR สเปกตรัมของ 4n



รูปภาพที่ 134 ^{13}C NMR สเปกตรัมของ 4n

รูปภาพที่ 135 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4n

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

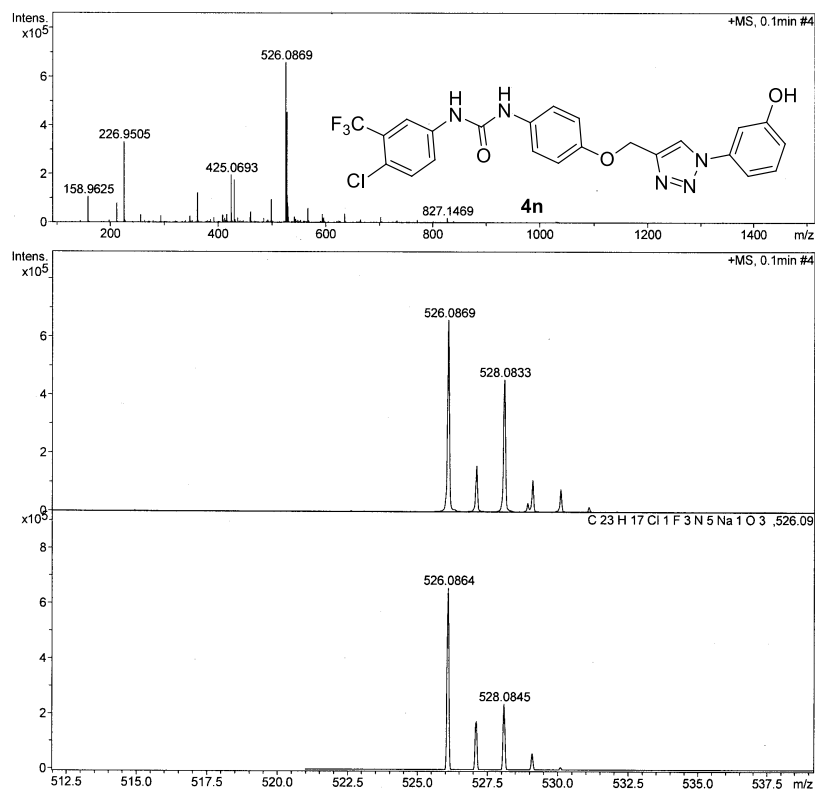
Analysis Name D:\Data\customer\CICFP3OH.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name CICFP3OH

Acquisition Date 2/7/2018 9:37:19 AM

Operator Sutichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

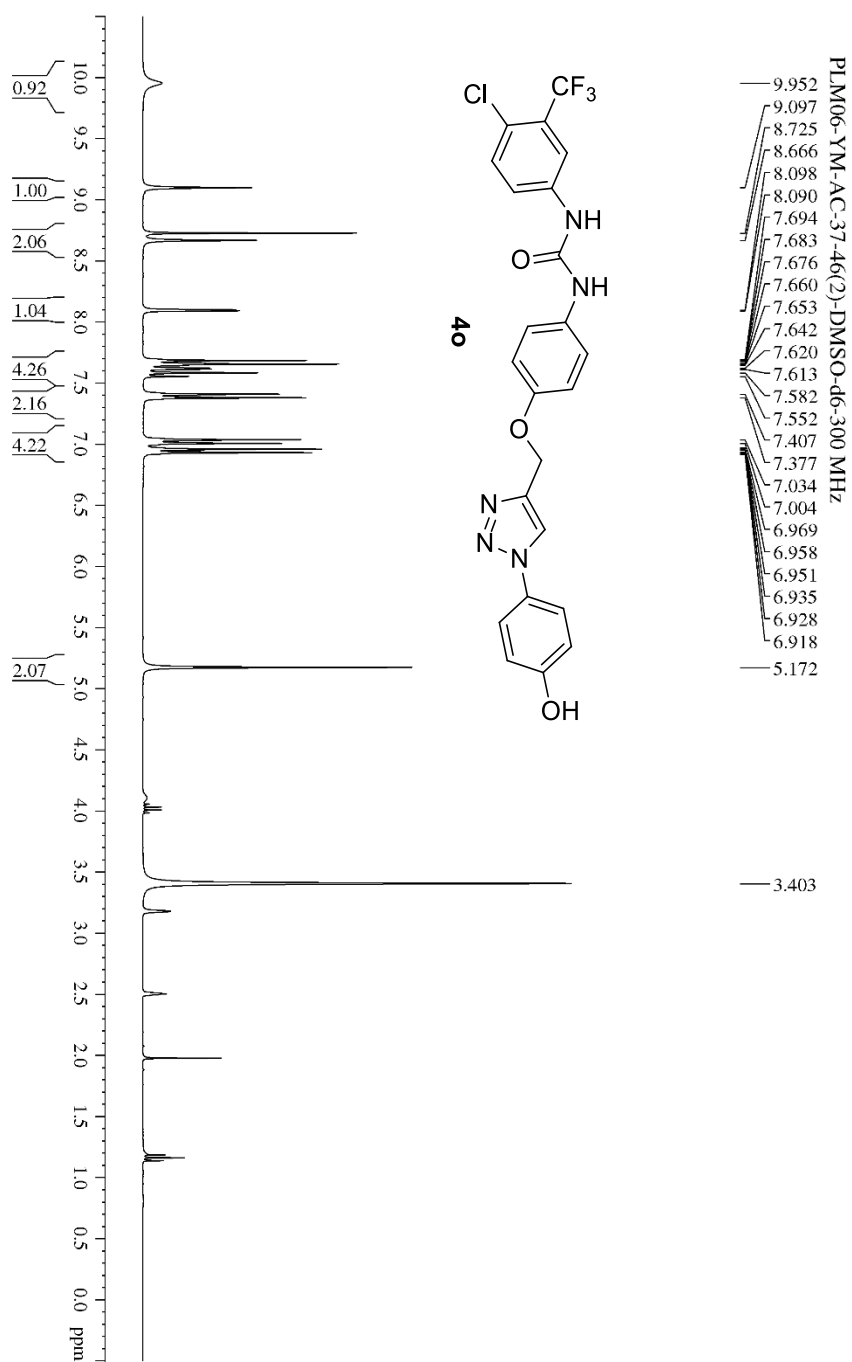


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

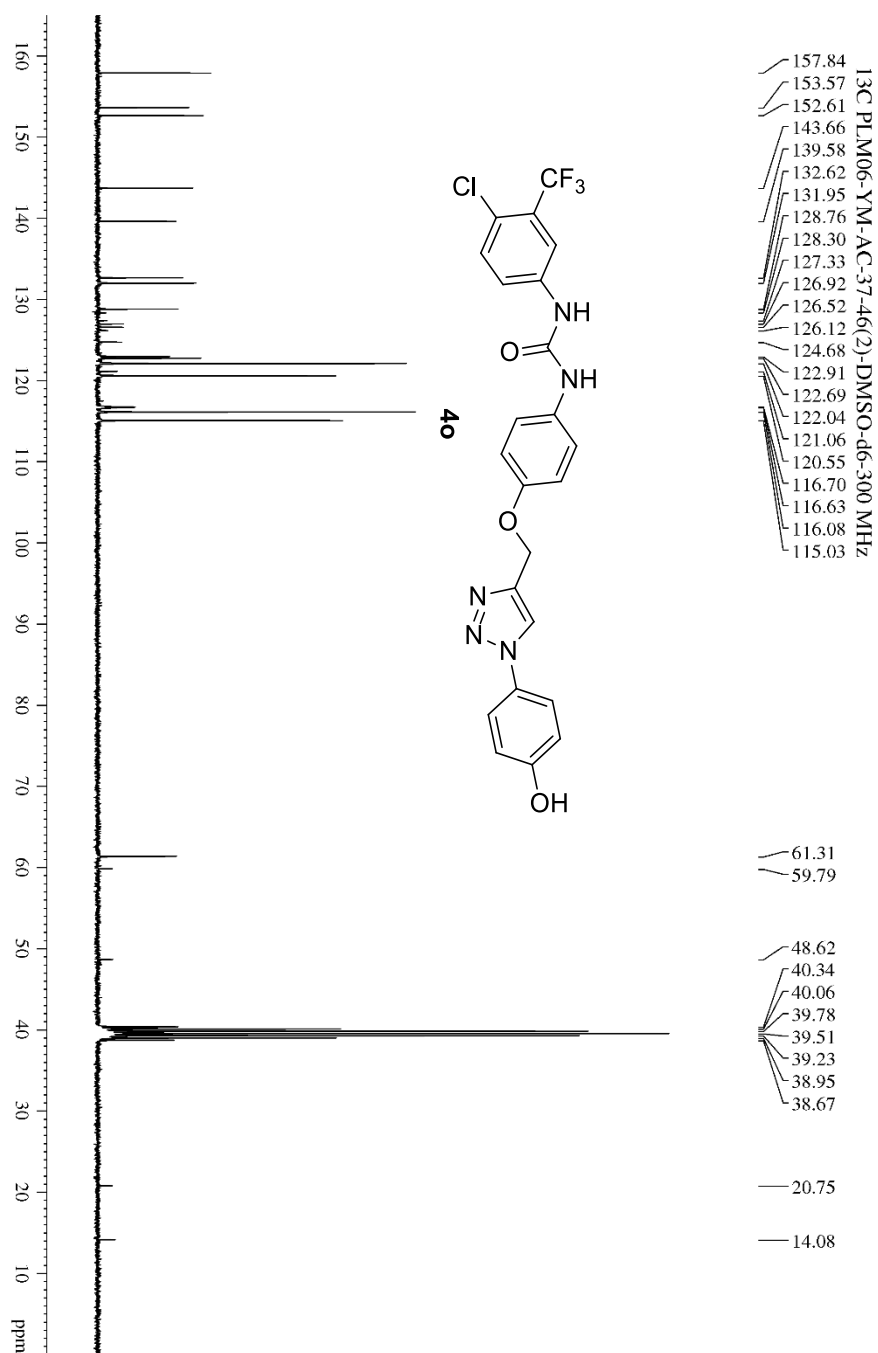
printed: 2/7/2018 2:55:03 PM

Page 1 of 1

รูปภาพที่ 136 MS สเปกตรัมของ 4n



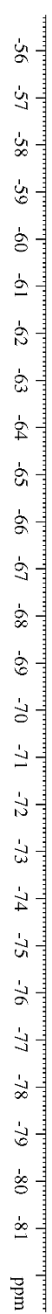
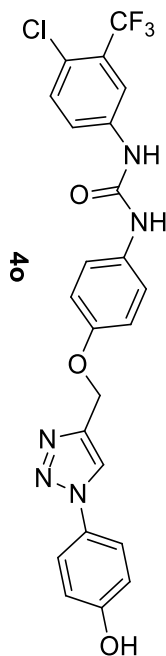
รูปภาพที่ 137 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4o



รูปภาพที่ 138 ¹³C NMR สเปกตรัมของ **4o**

19F PLM06-YM-AC-37-46(2)-DMSO-d6-300 MHz

— -63.96

รูปภาพที่ 139 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4o

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

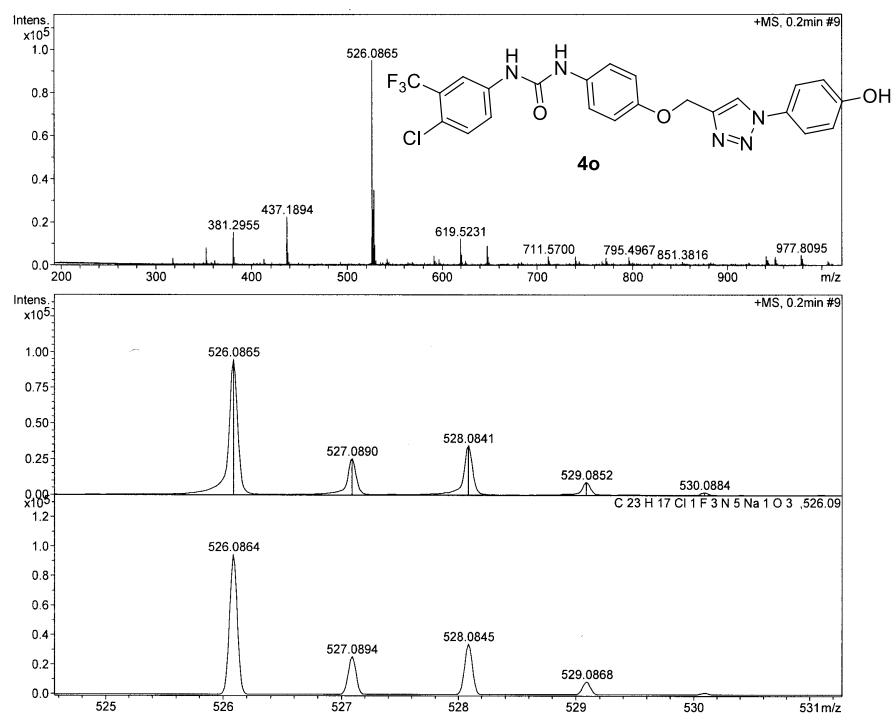
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\P 4OH.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name P 4OH

Acquisition Date 7/25/2017 12:42:54 PM

Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

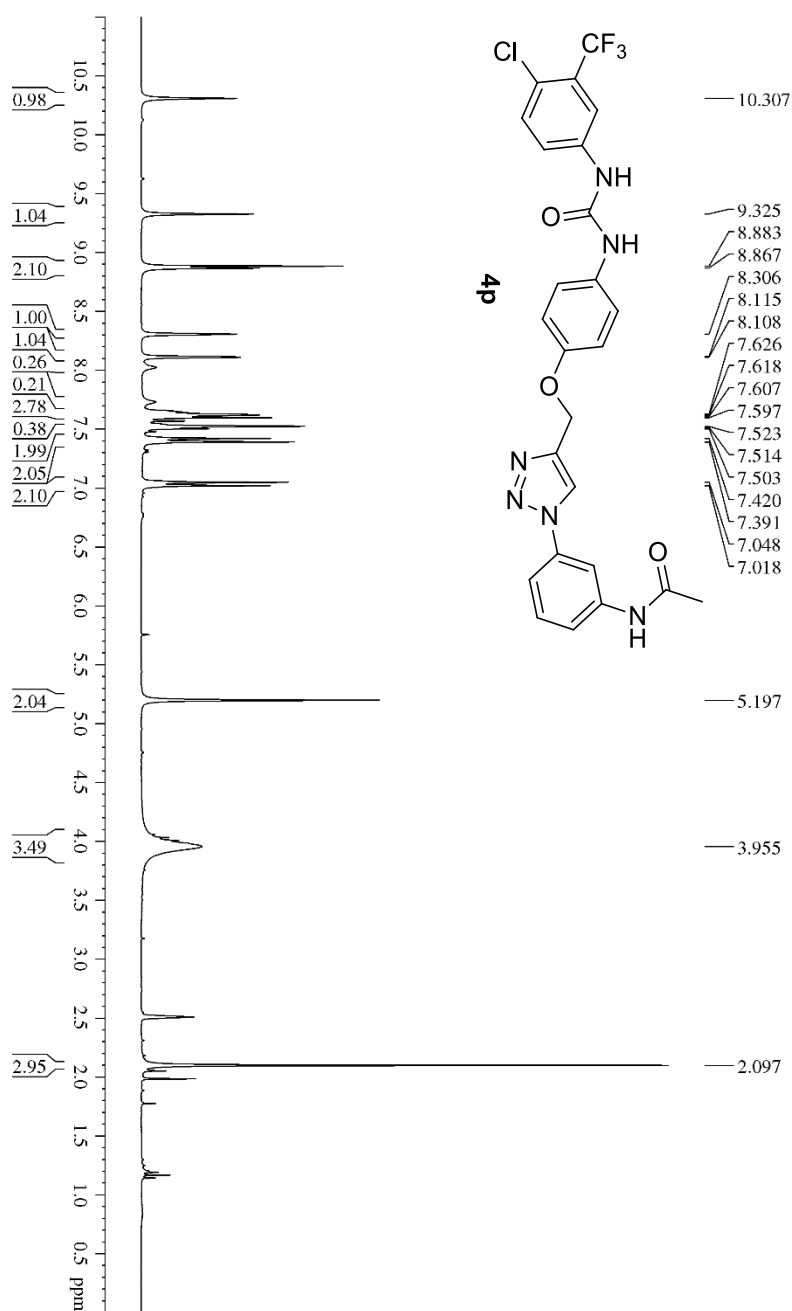


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

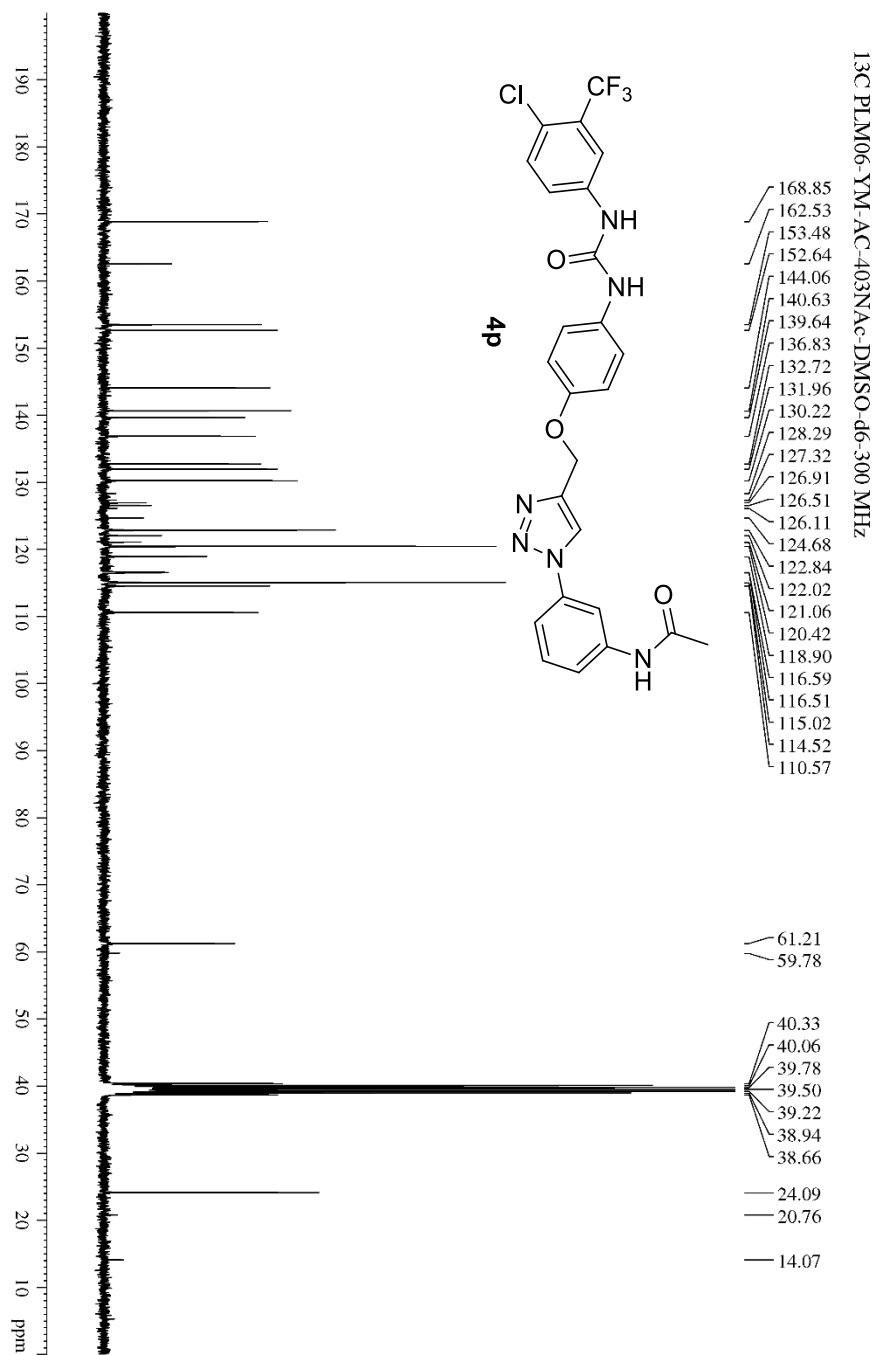
printed: 7/27/2017 9:25:54 AM

Page 1 of 1

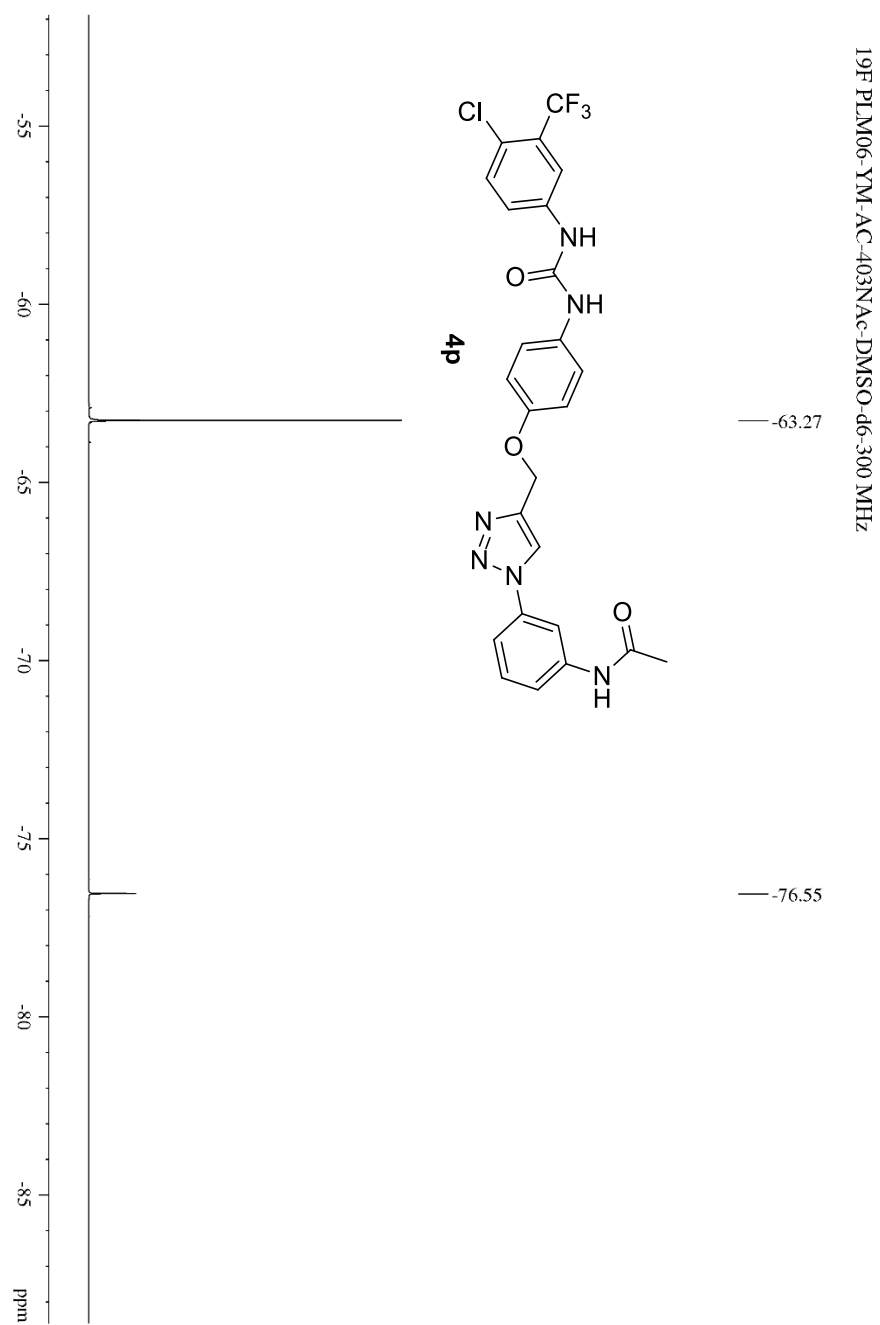
รูปภาพที่ 140 MS สเปกตรัมของ 4o

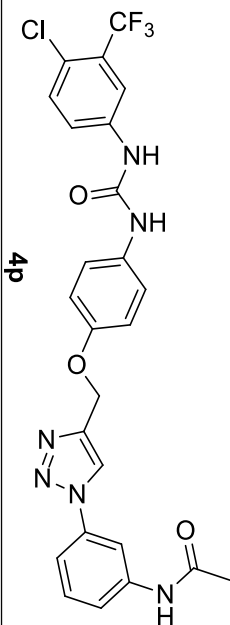


รูปภาพที่ 141 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4p



รูปภาพที่ 142 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4p

รูปภาพที่ 143 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4p



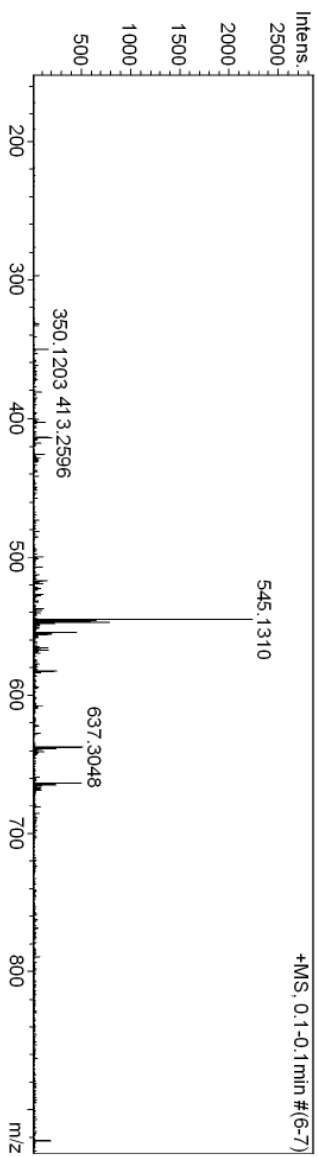
Mass Spectrum List Report

Analysis Info

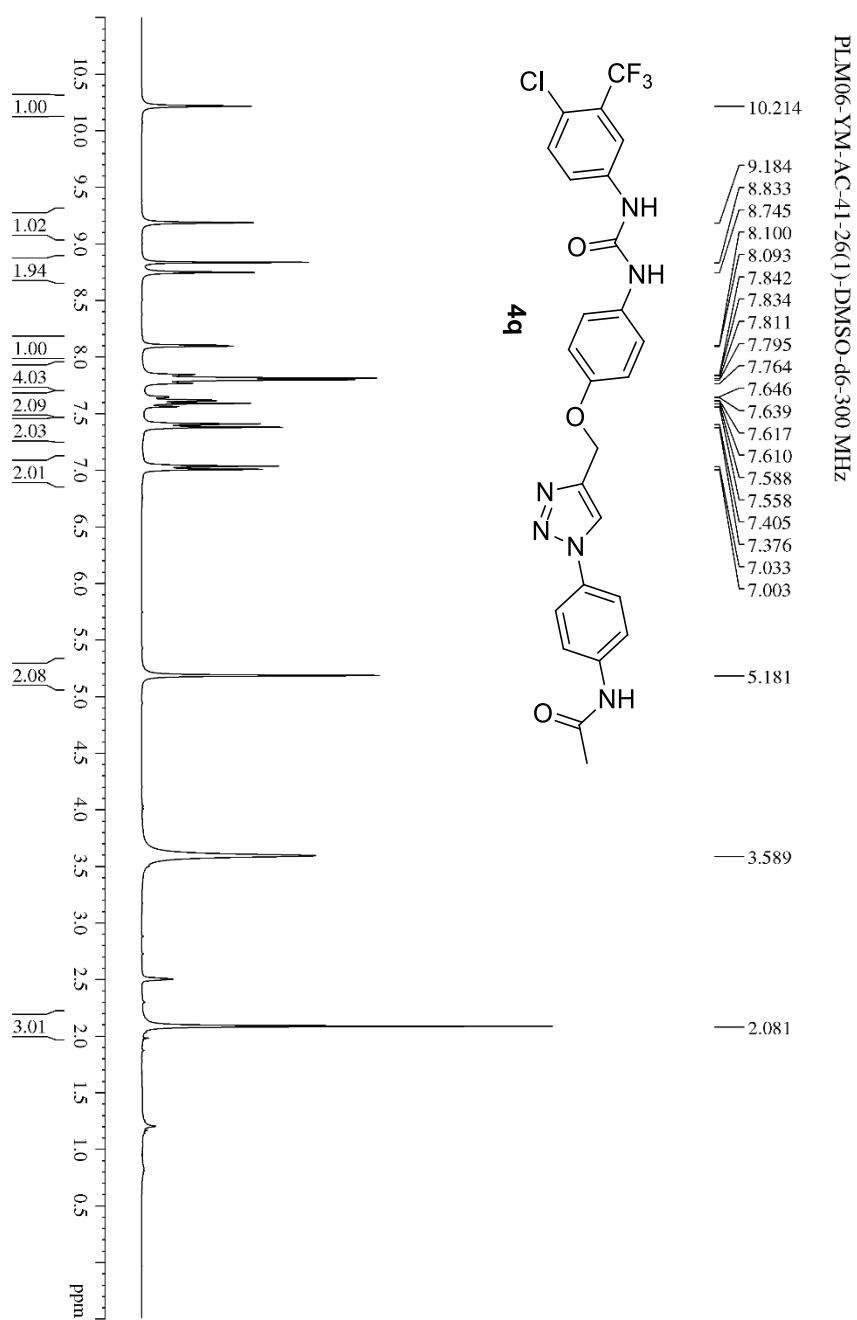
Analysis Name OSSSU05032019009.d Acquisition Date 3/5/2019 3:54:40 PM
 Method Tune_Low_80_POS_2019.m Operator Administrator
 Sample Name 33 Instrument micrOTOF 72
 05032019

Acquisition Parameter

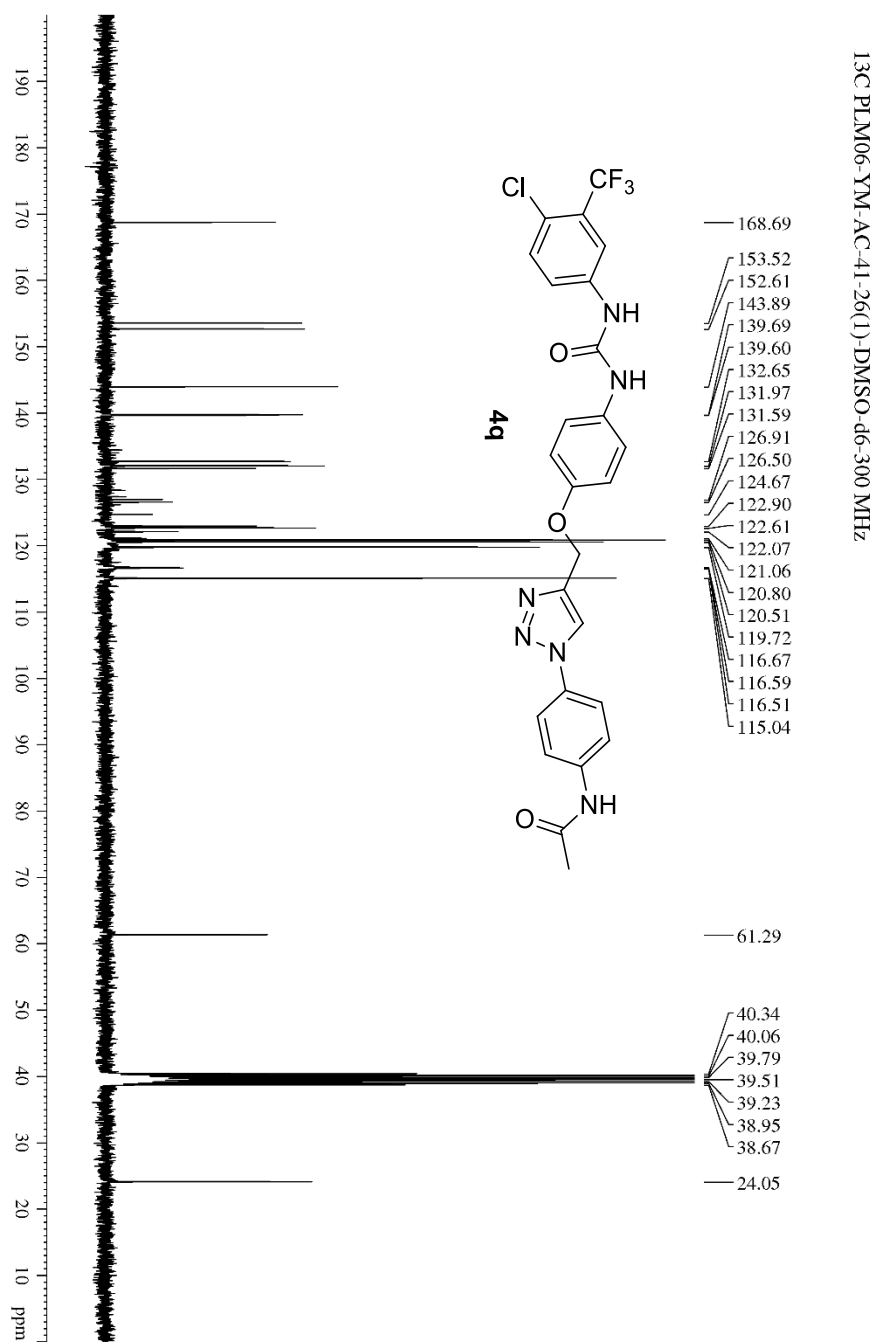
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Corrector Fill	50 V
Scan Range	n/a	Capillary Exit	180.0 V	Set Pulsar Pull	337 V
Scan Begin	50 m/z	Hexapole RF	400.0 V	Set Pulsar Push	337 V
Scan End	3000 m/z	Skimmer 1	45.0 V	Set Reflector	1300 V
		Hexapole 1	24.3 V	Set Flight Tube	9000 V
				Set Detector TOF	2295 V



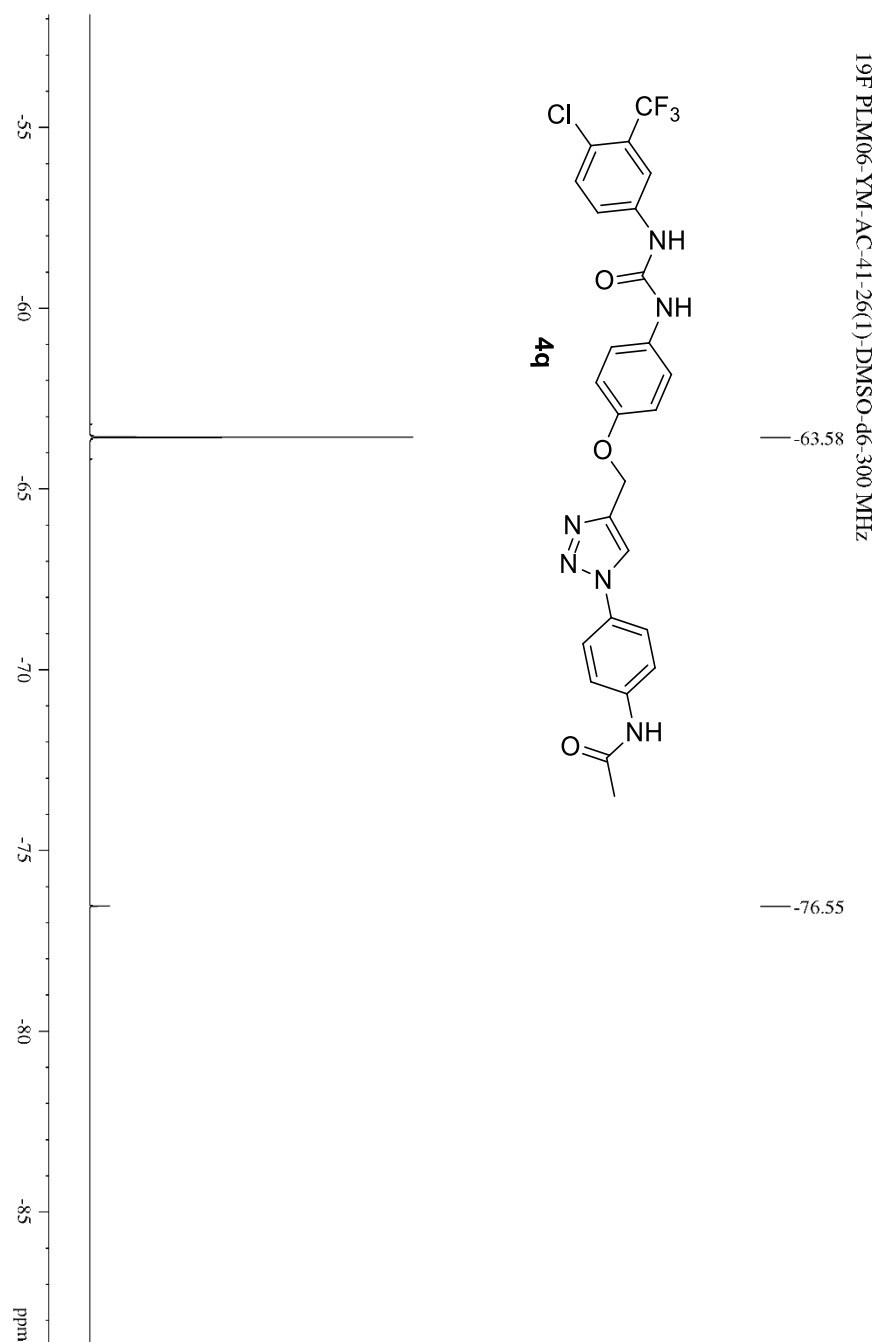
รูปภาพที่ 144 MS สเปกตรัมของ 4p



รูปภาพที่ 145 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4q



รูปภาพที่ 146 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4q

รูปภาพที่ 147 ¹⁹F NMR สเปกตรัมของ 4q

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

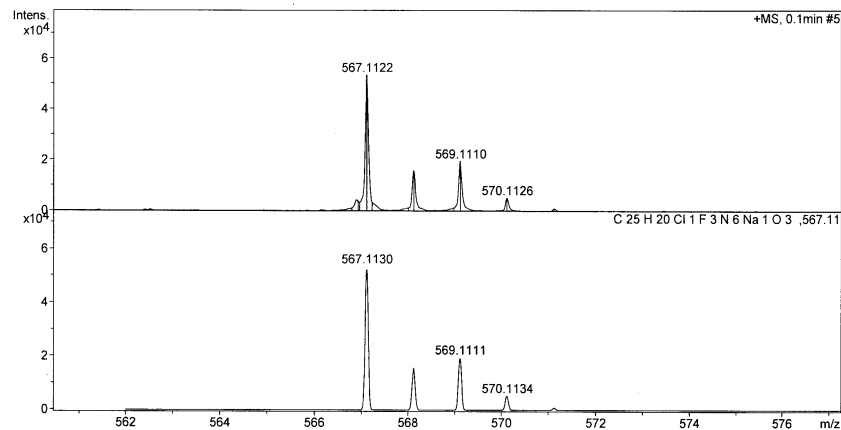
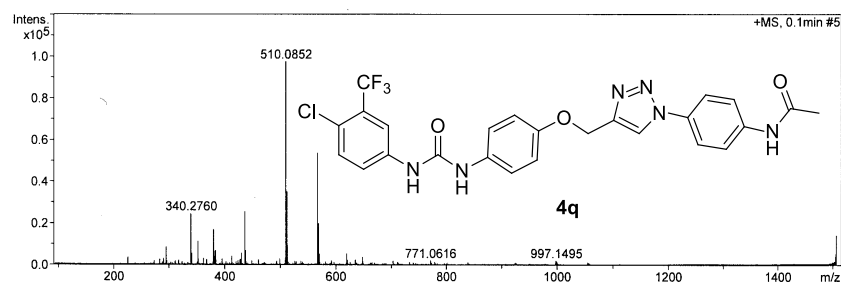
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\IP 4NHAc.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name P 4 NHAc

Acquisition Date 7/25/2017 11:40:20 AM

Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

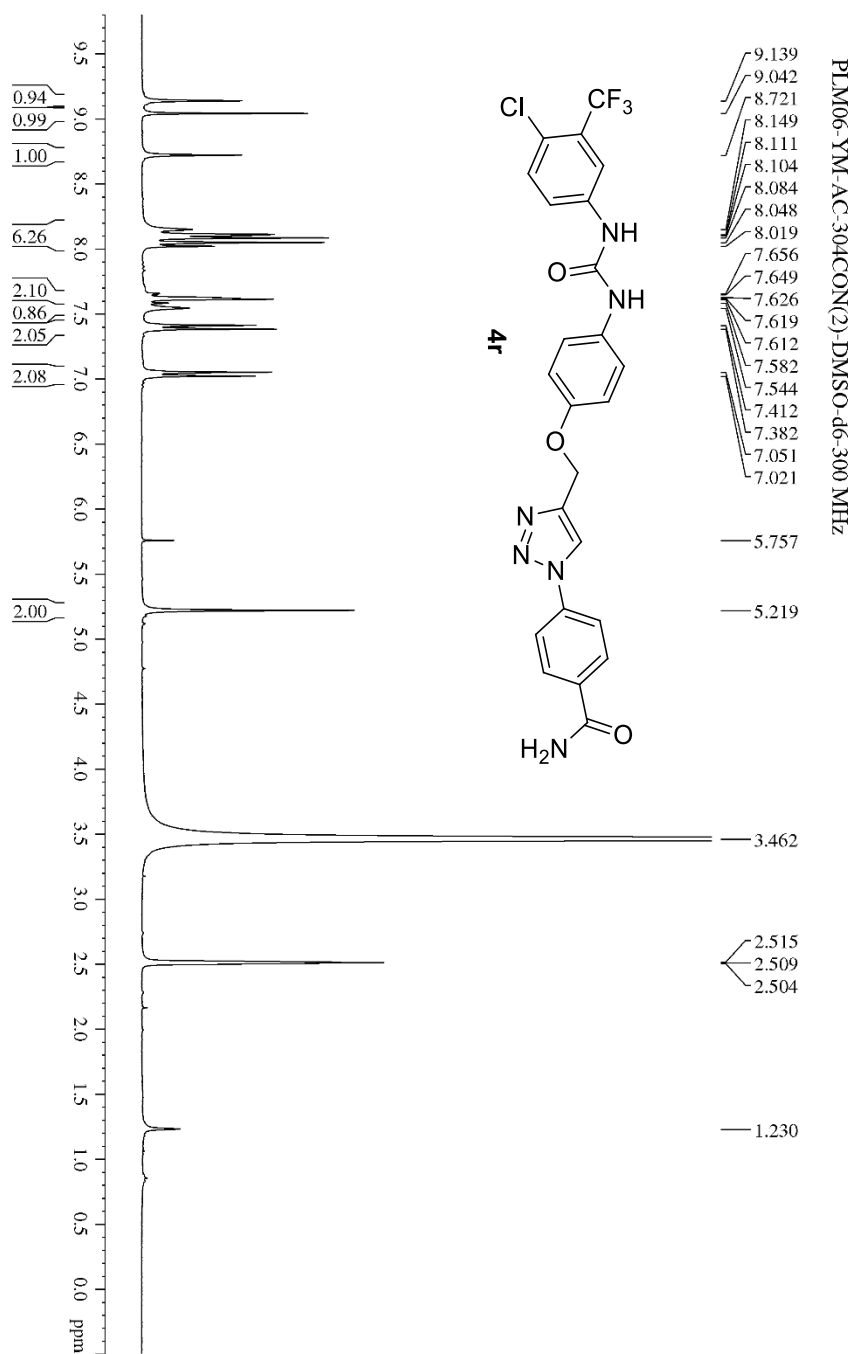


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

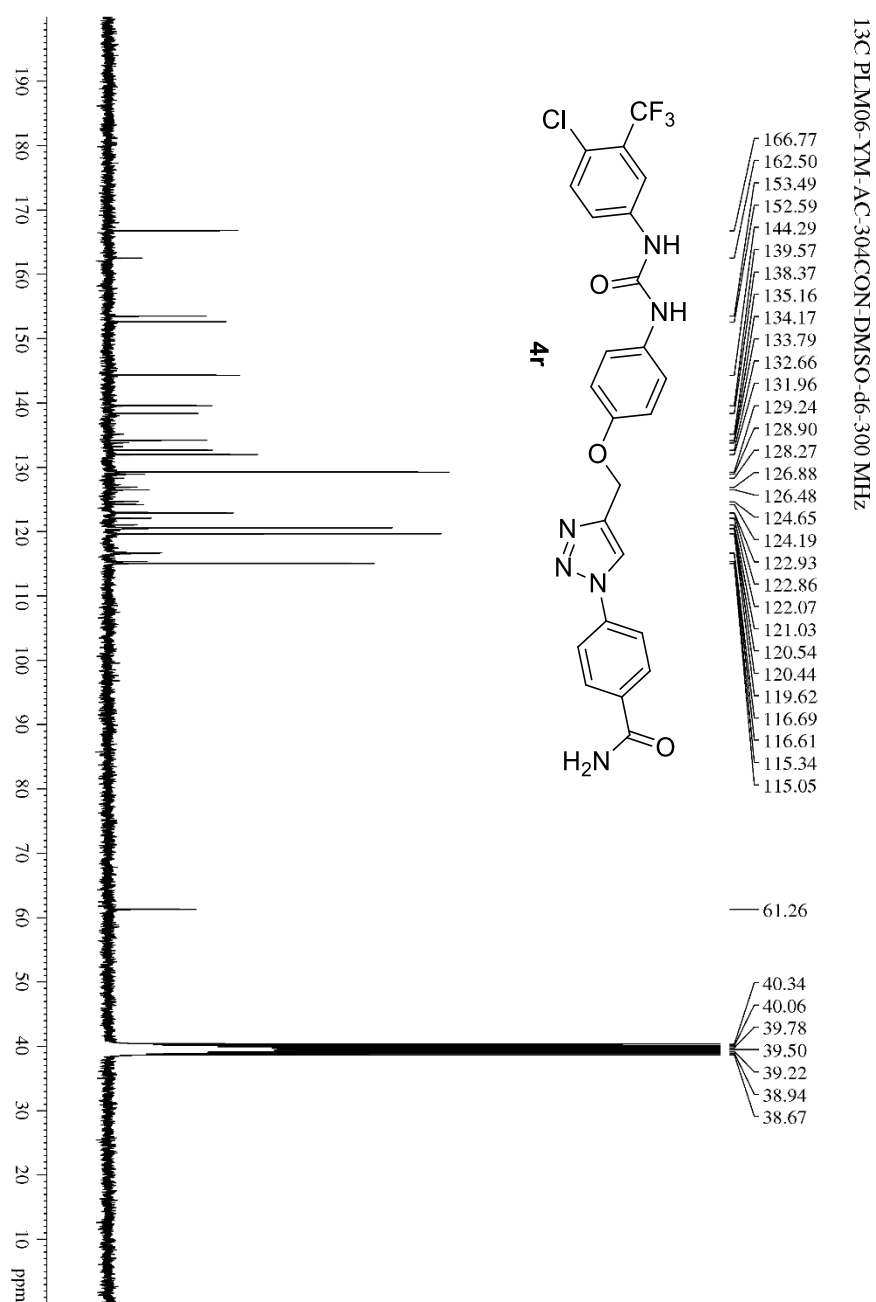
printed: 7/27/2017 9:12:22 AM

Page 1 of 1

รูปภาพที่ 148 MS สเปกตรัมของ 4q

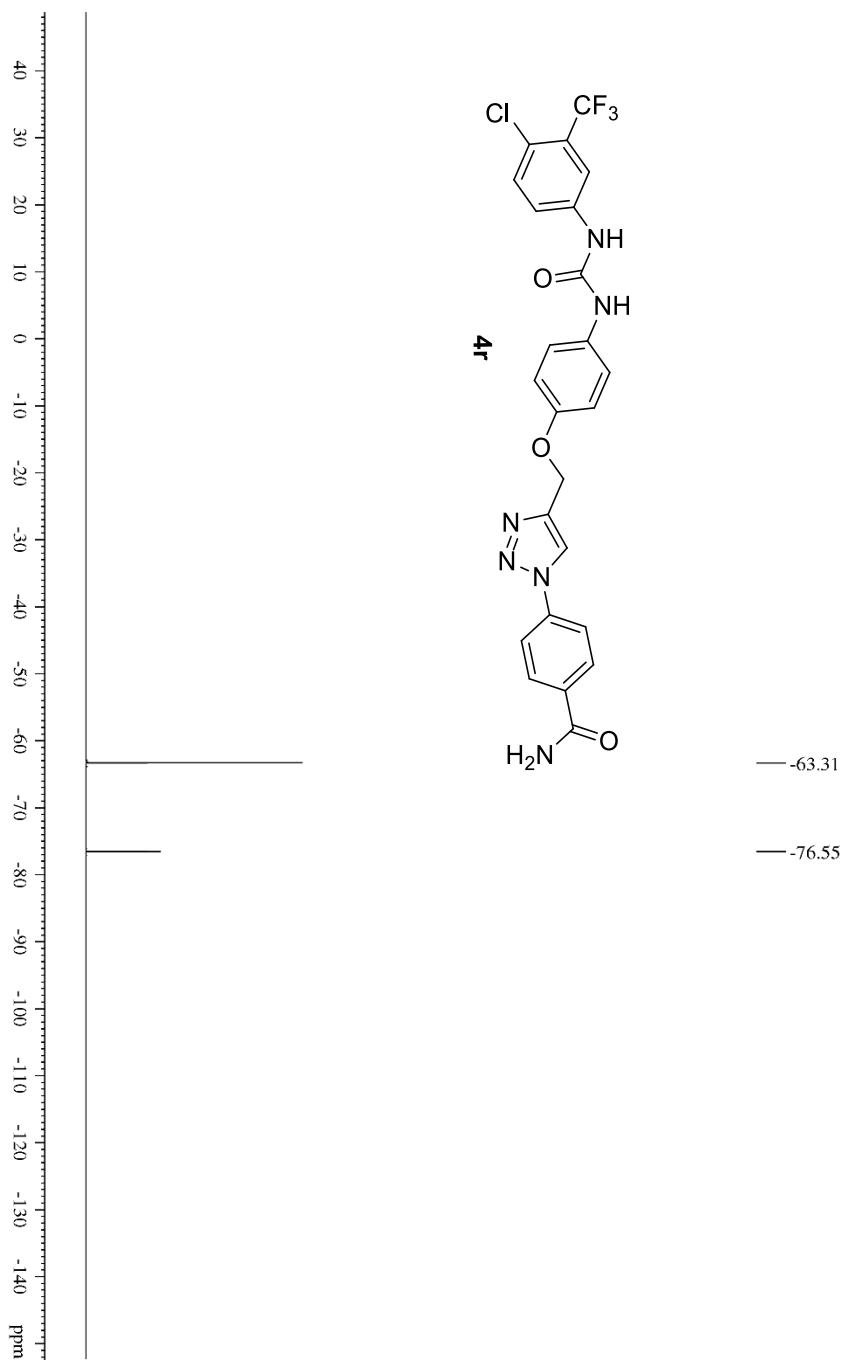


รูปภาพที่ 149 ¹H NMR สเปกตรัมของ 4r



รูปภาพที่ 150 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4r

^{19}F PLM06-YM-AC-304CON-DMSO-d₆-300 MHz



รูปภาพที่ 151 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4r

BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

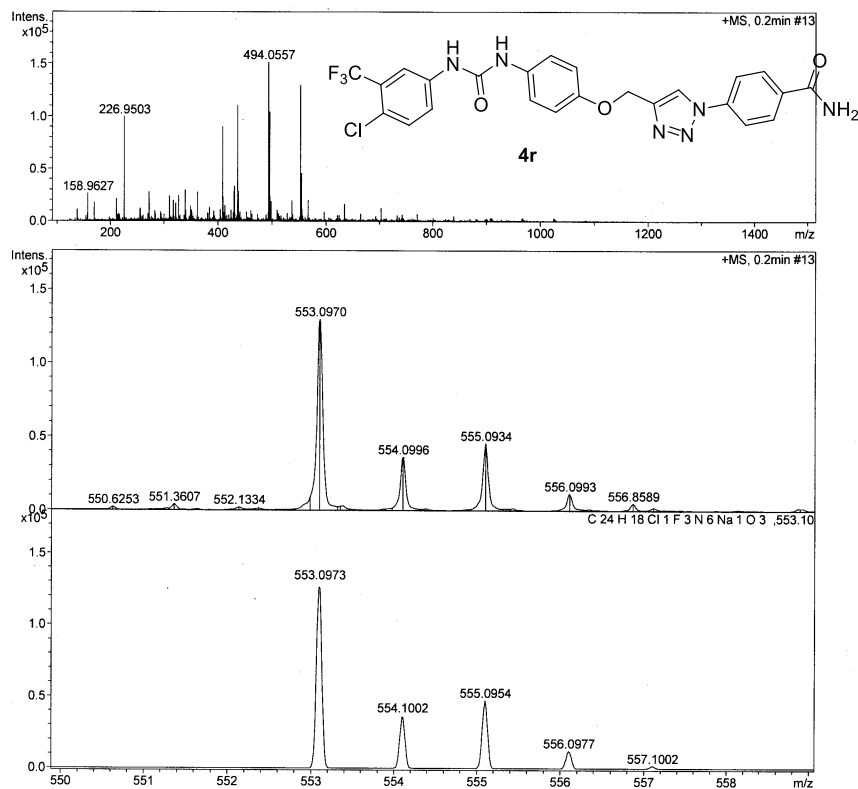
Analysis Name D:\Data\customer\3OP4CON.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name 3OP4CON
 4

Acquisition Date 2/7/2018 12:44:36 PM

Operator Sutichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

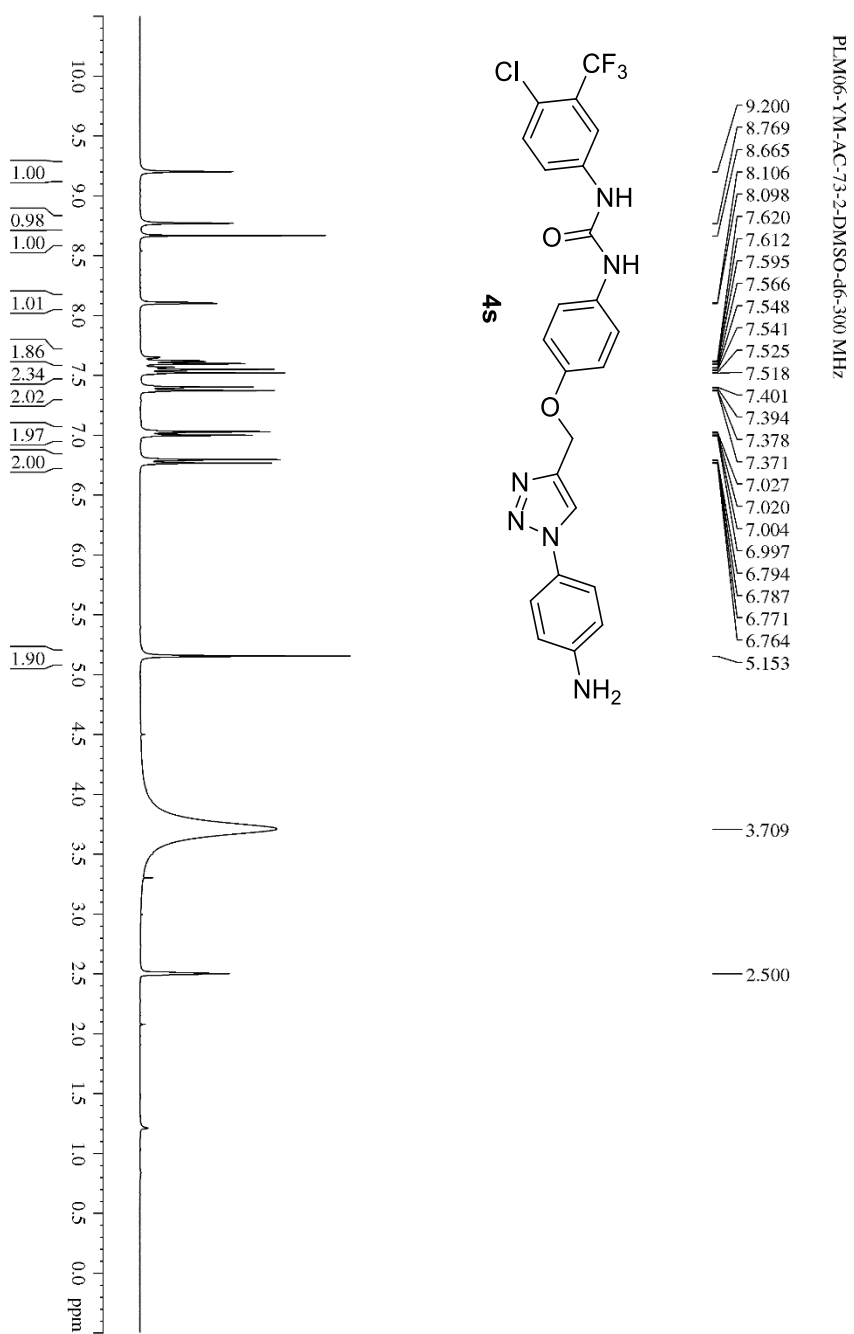


Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

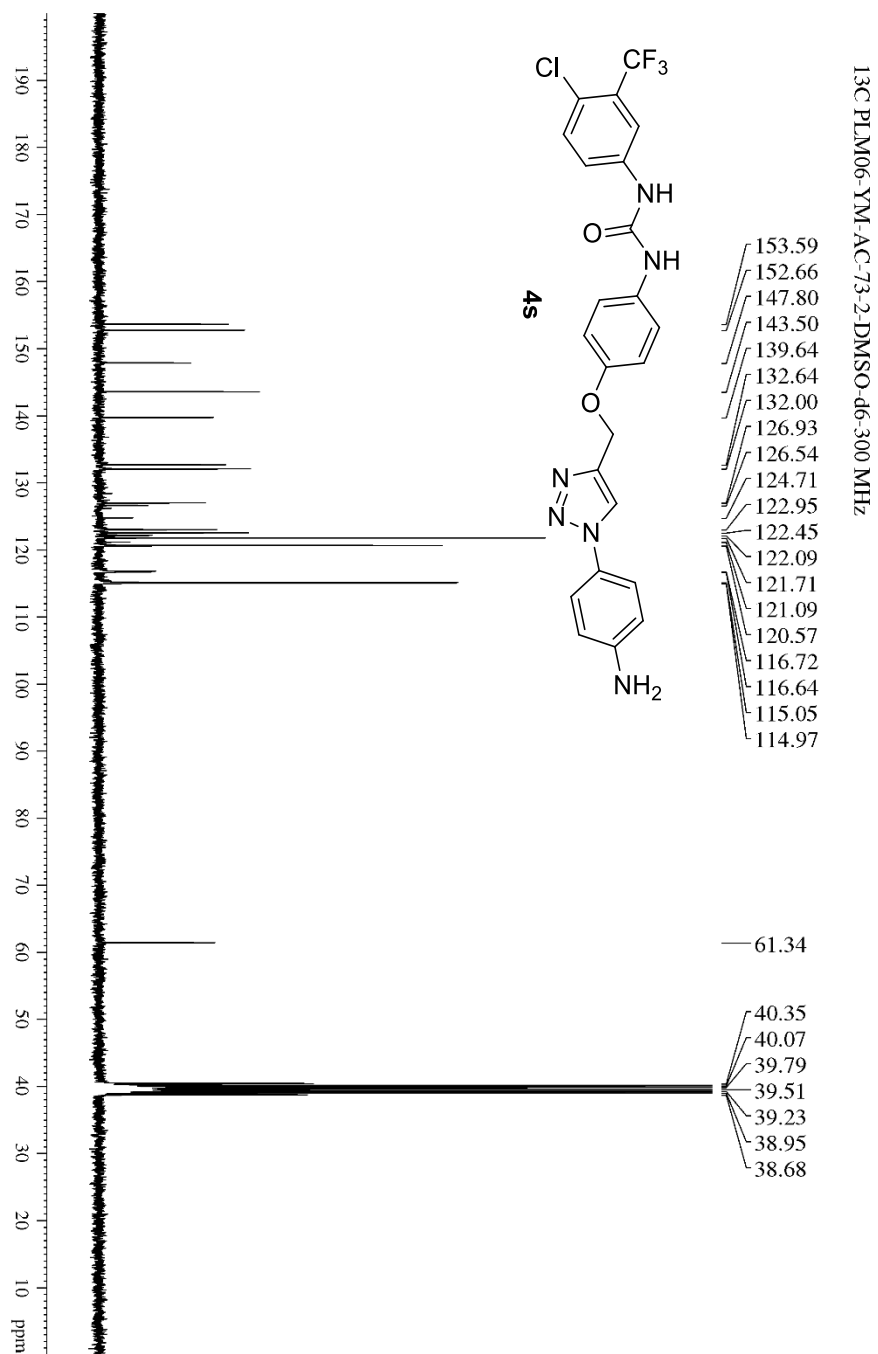
printed: 2/7/2018 2:58:22 PM

Page 1 of 1

รูปภาพที่ 152 MS สเปกตรัมของ 4r

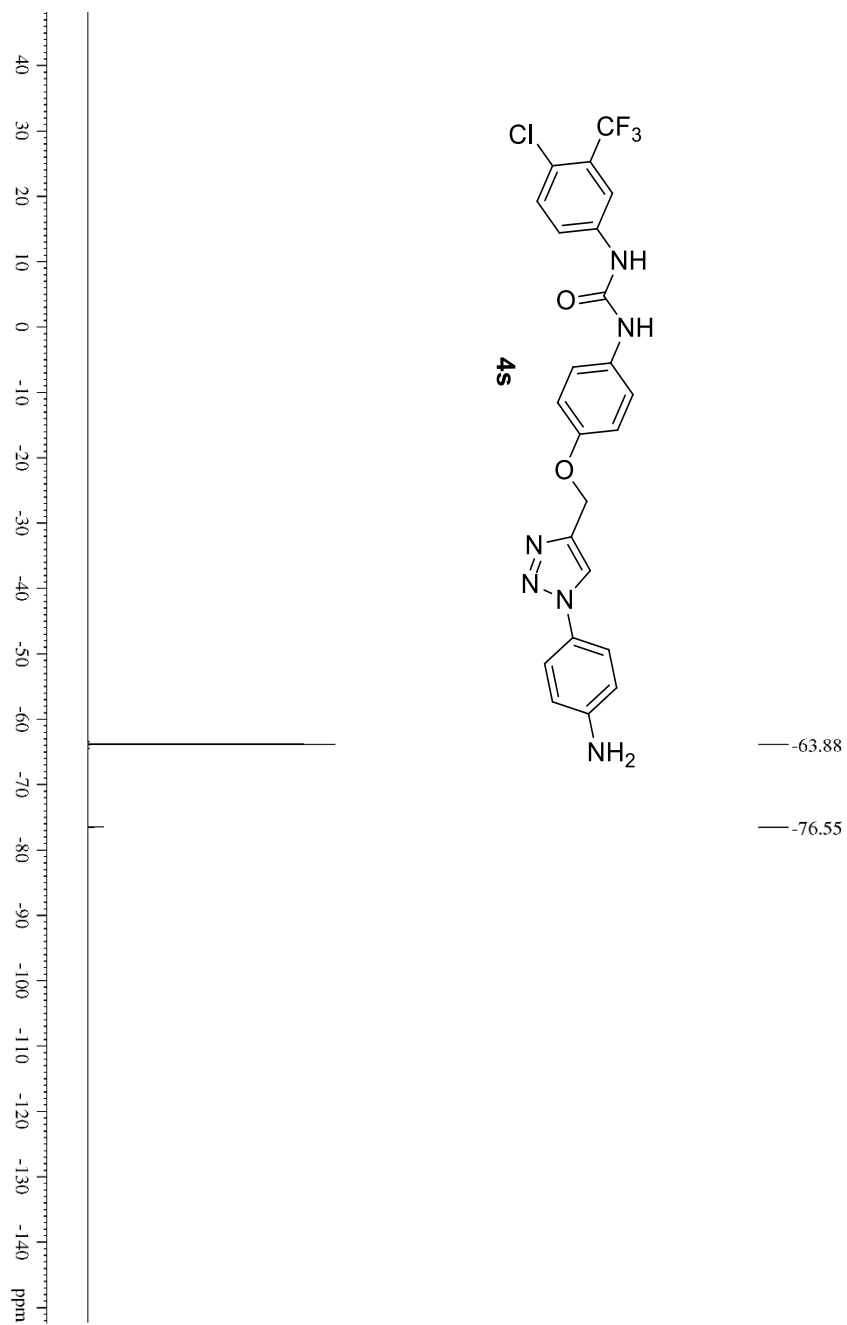


รูปภาพที่ 153 ^1H NMR สเปกตรัมของ **4s**



รูปภาพที่ 154 ¹³C NMR สเปกตรัมของ 4s

19F PLM06-YM-AC-73-1-DMSO-d6-300 MHz

รูปภาพที่ 155 ^{19}F NMR สเปกตรัมของ 4s

 BIORESOURCES RESEARCH UNIT

High resolution report

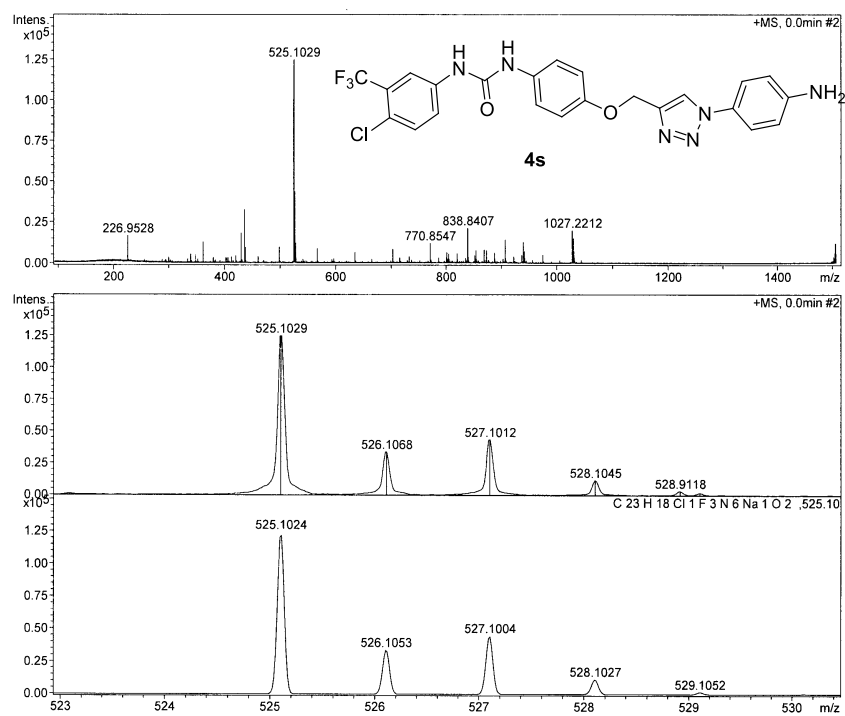
Analysis Name C:\Documents and Settings\biotec\Desktop\cus\P 4NH2.d
 Method NaFormate_pos.m
 Sample Name P 4NH2

Acquisition Date 7/25/2017 10:36:25 AM

Operator Stuichai Ext: 3560
 Instrument micrOTOF Bruker
 Calibrate by Sodium Formate

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4

printed: 7/27/2017 9:02:00 AM

Page 1 of 1

รูปภาพที่ 156 MS สเปกตรัมของ 4s

รายการอ้างอิง

1. Thailand Source: Globocan 2018.
<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/764-thailand-fact-sheets.pdf>
(accessed 10 May 2019).
2. . แนวทางการดูแลผู้ป่วยมะเร็งเรื้อรังตับในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2558.
<http://www.gastrothai.net/source/content-file/178.Thailand%20Guideline%20for%20Hepatocellular%20Carcinoma.pdf> (accessed 1 August 2015).
3. Intaraprasong, P., Review New therapy including combination. *Thai Journal of HEPATOLOGY* **2018**, *1*, 33-36.
4. Kudo, M.; Finn, R. S.; Qin, S.; Han, K.-H.; Ikeda, K.; Piscaglia, F.; Baron, A.; Park, J.-W.; Han, G.; Jassem, J.; Blanc, J. F.; Vogel, A.; Komov, D.; Evans, T. R. J.; Lopez, C.; Dutcus, C.; Guo, M.; Saito, K.; Kraljevic, S.; Tamai, T.; Ren, M.; Cheng, A.-L., Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet* **2018**, *391* (10126), 1163-1173.
5. Keating, G., Sorafenib: A Review in Hepatocellular Carcinoma. *Targeted Oncology* **2017**, *12*, 1-11.
6. El-Damasy, A. K.; Lee, J.-H.; Seo, S. H.; Cho, N.-C.; Pae, A. N.; Keum, G., Design and synthesis of new potent anticancer benzothiazole amides and ureas featuring pyridylamide moiety and possessing dual B-RafV600E and C-Raf kinase inhibitory activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *115*, 201-216.
7. Yao, J.; He, Z.; Chen, J.; Chen, D.; Sun, W.; Xu, W., Design, Synthesis and Antiproliferative Activities of Diaryl Thiourea Derivatives as Anticancer Agents. *Chinese Journal of Chemistry* **2012**, *30* (10), 2423-2430.
8. Yao, J.; He, Z.; Chen, J.; Sun, W.; Fang, H.; Xu, W., Design, synthesis and biological activities of sorafenib derivatives as antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22* (21), 6549-6553.
9. Sun, S.; He, Z.; Huang, M.; Wang, N.; He, Z.; Kong, X.; Yao, J., Design and

discovery of thioether and nicotinamide containing sorafenib analogs as multikinase inhibitors targeting B-Raf, B-Raf V600E and VEGFR-2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, *26* (9), 2381-2391.

10. Wang, M.; Xu, S.; Lei, H.; Wang, C.; Xiao, Z.; Jia, S.; Zhi, J.; Zheng, P.; Zhu, W., Design, synthesis and antitumor activity of Novel Sorafenib derivatives bearing pyrazole scaffold. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2017**, *25* (20), 5754-5763.

11. Lu, C.-S.; Tang, K.; Li, Y.; Jin, B.; Yin, D.-L.; Ma, C.; Chen, X.-G.; Huang, H.-H., Synthesis and in vitro antitumor activities of novel benzyl urea analogues of sorafenib. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* **2013**, *48*, 709-17.

12. Kong, X.; Yao, Z.; He, Z.; Xu, W.; Yao, J., Design, synthesis and biological evaluation of thiourea and nicotinamide-containing sorafenib analogs as antitumor agents. *MedChemComm* **2015**, *6* (5), 867-870.

13. Džolić, Z. R.; Perković, I.; Pavelić, S. K.; Sedić, M.; Ilić, N.; Schols, D.; Zorc, B., Design, synthesis, and cytostatic activity of novel pyrazine sorafenib analogs. *Medicinal Chemistry Research* **2016**, *25* (12), 2729-2741.

14. Sun, S.; Zhang, J.; Wang, N.; Kong, X.; Fu, F.; Wang, H.; Yao, J., Design and Discovery of Quinazoline- and Thiourea-Containing Sorafenib Analogs as EGFR and VEGFR-2 Dual TK Inhibitors. *Molecules* **2017**, *23*, 24.

15. Khandan, M.; Rizi, S.; Khodarahmi, G.; Hassanzadeh, F., Synthesis and cytotoxic evaluation of some novel diarylamide possessing quinoxalinedione based on sorafenib. *Research in Pharmaceutical Sciences* **2018**, *13*, 168.

16. Guo, Z.; Yan, Z.; Zhou, X.; Wang, Q.; Lu, M.; Liu, W.; Zhou, H.; Yang, C.; McClain, E. J., Synthesis and biological evaluation of novel 1,2-benzisothiazol-3-one-derived 1,2,3-triazoles as caspase-3 inhibitors. *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24* (5), 1814-1829.

17. Jasmer, R. ASCO: Sorafenib Halts Resistant Thyroid Cancer.

<https://www.medpagetoday.com/meetingcoverage/asco/39545> (accessed 10 may 2019).

18. Cheng, A.-L.; Guan, Z.; Chen, Z.; Tsao, C.-J.; Qin, S.; Kim, J. S.; Yang, T.-S.; Tak, W. Y.; Pan, H.; Yu, S.; Xu, J.; Fang, F.; Zou, J.; Lentini, G.; Voliotis, D.; Kang, Y.-K., Efficacy and safety of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma according to baseline status: Subset analyses of the phase III Sorafenib Asia-Pacific trial.

European Journal of Cancer **2012**, *48* (10), 1452-1465.

19. Wilhelm, S. M.; Carter, C.; Tang, L.; Wilkie, D.; McNabola, A.; Rong, H.; Chen, C.; Zhang, X.; Vincent, P.; McHugh, M.; Cao, Y.; Shujath, J.; Gawlak, S.; Eveleigh, D.; Rowley, B.; Liu, L.; Adhane, L.; Lynch, M.; Auclair, D.; Taylor, I.; Gedrich, R.; Voznesensky, A.; Riedl, B.; Post, L. E.; Bollag, G.; Trail, P. A., BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Research* **2004**, *64* (19), 7099.
20. Strumberg, D.; Schultheis, B., Regorafenib for cancer. *Expert opinion on investigational drugs* **2012**, *21*, 879-89.
21. Ravi, S.; Singal, A., Regorafenib: An evidence-based review of its potential in patients with advanced liver cancer. *Core evidence* **2014**, *9*, 81-7.
22. Kudo, M., Lenvatinib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer* **2017**, *6* (4), 253-263.
23. Pharmacology Review(s).
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206947Orig1s000PharmR.pdf
(accessed 17 October).
24. Yao, J.; Chen, J.; He, Z.; Sun, W.; Xu, W., Design, synthesis and biological activities of thiourea containing sorafenib analogs as antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20* (9), 2923-2929.
25. Yao, J.; Chen, J.; He, Z.; Sun, W.; Fang, H.; Xu, W., Thiourea and thioether derivatives of sorafenib: synthesis, crystal structure, and antiproliferative activity. *Medicinal Chemistry Research* **2013**, *22* (8), 3959-3968.
26. Zhang, J.; Wang, N.; Xie, X.; Yan, C.; Fu, F.; Yao, J.; Wang, H., Design, synthesis and biological activities of quinazoline containing sorafenib analogs as antitumor agents. *Wuhan University Journal of Natural Sciences* **2017**, *22* (3), 239-246.
27. Wu, C.; Wang, M.; Tang, Q.; Luo, R.; Chen, L.; Zheng, P.; Zhu, W., Design, Synthesis, Activity and Docking Study of Sorafenib Analogs Bearing Sulfonylurea Unit. *Molecules* **2015**, *20* (10), 19361-19371.
28. Wang, M.; xu, S.; Wu, C.; Liu, X.; Tao, H.; Huang, Y.; Liu, Y.; Zheng, P.; Zhu, W., Design, synthesis and activity of novel sorafenib analogues bearing chalcone unit.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2016**, *26* (22), 5450-5454.

29. Ye, W.; Yao, Q.; Yu, S.; Gong, P.; Qin, M., Synthesis and Antitumor Activity of Triazole-Containing Sorafenib Analogs. *Molecules* **2017**, *22*, 1759.
30. Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H., FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, *36* (7), 422-439.
31. Wan, P. T. C.; Garnett, M. J.; Roe, S. M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V. M.; Project, C. G.; Jones, C. M.; Marshall, C. J.; Springer, C. J.; Barford, D.; Marais, R., Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* **2004**, *116* (6), 855-867.
32. Wilkening, I.; Signore, G.; Hackenberger, C., Synthesis of phosphoramidate peptides by Staudinger reactions of silylated phosphinic acids and esters. *Chemical communications* **2011**, *47*, 349-51.
33. Hansen, T. V.; Wu, P.; Sharpless, W. D.; Lindberg, J. G., Just Click It: Undergraduate Procedures for the Copper(I)-Catalyzed Formation of 1,2,3-Triazoles from Azides and Terminal Acetylenes. *Journal of Chemical Education* **2005**, *82* (12), 1833.
34. Yoshimitsu, T.; Ino, T.; Tanaka, T., Total Synthesis of (-)-Agelastatin A. *Organic Letters* **2008**, *10* (23), 5457-5460.
35. Lejarazo Gómez Eva F., S. S. E., Suarez Torres Sara Reduction of Nitro Compounds, through Different Reaction Conditions (Combinatory Chemistry). *J. Chem. Chem. Eng.* **2018**, *12*, 74-82.
36. Xie, S.; Zhang, Y.; Ramström, O.; Yan, M., Base-catalyzed synthesis of aryl amides from aryl azides and aldehydes. *Chemical Science* **2016**, *7* (1), 713-718.
37. Gribanov, P. S.; Topchiy, M. A.; Golenko, Y. D.; Lichtenstein, Y. I.; Eshtukov, A. V.; Terekhov, V. E.; Asachenko, A. F.; Nechaev, M. S., An unprecedentedly simple method of synthesis of aryl azides and 3-hydroxytriazenes. *Green Chemistry* **2016**, *18* (22), 5984-5988.
38. Hu, H.; Zhang, A.; Ding, L.; Lei, X.; Zhang, L., Regioselective synthesis of 1-(2,6-dichloro-4-trifluoromethylphenyl)-4-alkyl-1H-[1,2,3]-triazoles. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2008**, *13* (3), 556-566.
39. Siddiki, A. A.; Takale, B. S.; Telvekar, V. N., One pot synthesis of aromatic azide

using sodium nitrite and hydrazine hydrate. *Tetrahedron Letters* **2013**, *54* (10), 1294-1297.

40. Stoddart, M., *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. 2011; Vol. 740.

41. Eamsaard, C. Synthesis and Cytotoxicity towards HepG2 and Huh7 of A New Series of Sorafenib Analoues : Replacing Picolinamide with A Triazole Ring. Silpakorn university, 2019.

42. Mitsos, C., *Isosteres in Medicinal Chemistry*. 2006.





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	โยธิน มาตะโก
วัน เดือน ปี เกิด	29 กันยายน 2536
สถานที่เกิด	นครปฐม
ที่อยู่ปัจจุบัน	72 ม.4 ต.ศรีษะทอง อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม 73120

